

551,655

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2004年10月14日 (14.10.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/087909 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/00, A01H 5/00,
C12N 1/19, 1/21, 9/88, C12P 17/02

(74) 代理人: 藤野 清也, 外(FUJINO, Seiya et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門2丁目7番7号 虎ノ門中田ビル4階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004214

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日: 2004年3月25日 (25.03.2004)

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-092337 2003年3月28日 (28.03.2003) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人日本大学 (NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 綾部 真一 (AYABE, Shin-ichi) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 明石 智義 (AKASHI, Tomoyoshi) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 青木 俊夫 (AOKI, Toshio) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP).

添付公開書類:

- 國際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE ENCODING 2-HYDROXYISOFLAVANONE DEHYDRATASE AND APPLICATION OF THE SAME

(54) 発明の名称: 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチドおよびその応用

(57) Abstract: 2-Hydroxyisoflavanone dehydratase substantially having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 is isolated from licorice. Further, a polynucleotide encoding 2-hydroxyisoflavanone dehydratase of the SEQ ID NO:2 is obtained. Furthermore, the amino acid sequence of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase is identified from soybean and a polynucleotide encoding 2-hydroxyisoflavanone dehydratase is obtained.

(57) 要約: カンゾウから配列番号1で表わされるアミノ酸配列を実質的に有する2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼが単離された。また、配列番号2の2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチドが取得できた。さらに、ダイズからも2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのアミノ酸配列を同定、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチドが取得できた。

WO 2004/087909 A1

明細書

2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチド およびその応用

[技術分野]

本発明は、2-ヒドロキシイソフラバノンの脱水反応を触媒する2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ、それをコードする新規ポリヌクレオチド、及びその応用に関する。

[背景技術]

イソフラボンおよびイソフラボンから誘導される化合物（イソフラボノイド）は、マメ科植物特有の成分で、近年、健康補助食品として注目されている。そして、イソフラボンを含むイソフラボノイドは、抗菌物質や共生シグナルとして植物が生物環境に適応するために極めて重要な役割を果たすことが知られている。

イソフラボノイドの最も簡単な骨格はイソフラボンであって、フラボノイド代謝によって生成されるイソフラボノイドグループのきわめて初期の産物である（図1参照）。イソフラボンとそのグリコシド（配糖体）はマメ科植物の器官に蓄積され、ダイズの種子に含まれるダイゼイン（7,4'-ジヒドロキシイソフラボン）やゲニステイン（5,7,4'-トリヒドロキシイソフラボン）の遊離体および配糖体は健康を促進し、疾病を予防するフィトエストロゲン（植物エストロゲン）として知られている。

イソフラボンは、生態生理学的に活性のあるイソフラボノイド、たとえば、プロトカルパンやイソフラボン骨格を有する抗菌性のフィトアレキシンが生合成される場合の中間体である。イソフラボノイドのうち約50%は4'-メトキシルに由来する官能基を有し、これらは主として4'-メトキシル化されたイソフラボンであるフォルモノネチン（7-ヒドロキシ-4'-メトキシイソフラボン）に由来する。

イソフラボノイド骨格は、シトクロムP450（P450）、すなわち2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ（IFS）の作用によって、(2S)-フラバノンから生合

成される。IFS は 1, 2-アリル基転位を伴うフラボノイド骨格の 2 位の炭素のヒドロキシル化を触媒する。生成物である 2-ヒドロキシイソフラバノンは脱水されてイソフラボンを形成する（図 1 参照）。

IFS の cDNA は、マメ科植物である *Glycyrrhiza echinata*（以下カンゾウと記載する。）（非特許文献 1、特許文献 1）およびダイズ（非特許文献 2、非特許文献 3）から同定されている。酵母のミクロソームで過剰発現させた組換え IFS を用いたインピトロ検定では、最初の生成物である 2-ヒドロキシイソフラバノンに加えて、多量のイソフラボンが自発的な脱水によって生成した（非特許文献 1、非特許文献 3）。さらに、昆虫細胞で発現した IFS は、イソフラボンのみを生産することが報告された（非特許文献 2）。このように、IFS 反応の直接生成物からイソフラボン生産を非酵素的に進めることができること、および IFS の基質である (2S)-フラバノンはマメ科および非マメ科植物の共通の成分であることから、IFS を用いてイソフラボノイドを含まない非マメ科植物を形質転換することによって、それらをイソフラボン產生植物に変換することができると推測された（非特許文献 4、非特許文献 5、非特許文献 6）。

このような知見に基づき、イソフラボンを本来含有しない非マメ科植物（シロイヌナズナやタバコ）にダイズ IFS 遺伝子を導入して非マメ科植物によるイソフラボン生産が試みられたが、その生産量はダイズ種子の 1/1000 程度というわずかな量であった（非特許文献 3、非特許文献 7、非特許文献 8）。よって、IFS のみでは、イソフラボンの生産は効率的に行われないということが推測される。

一方、2, 7, 4'-トリヒドロキシイソフラバノンをダイゼインに変換する 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの酵素活性が *Pueraria lobata*（クズマメ）の細胞で検出され、そのタンパク質が精製された（非特許文献 9、非特許文献 10）。また、本発明者らの実験によると、カンゾウの無細胞抽出物では、2, 7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンはフォルモノネチンに変換されたが、2, 7, 4'-トリヒドロキシイソフラバノンはダイゼインに変換されなかった（非特許文献 11）。これらの結果は、植物細胞での 2-ヒドロキシイソフラバノンからイソフラボンへの脱水が酵素（2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラタ

一ゼ)に依存しており、酵素が置換基の異なる2-ヒドロキシイソフラボンに対して基質特異性を有していることを示している。

このように、従来の研究によって、IFSのみでは、イソフラボンの生産は効率的に行えないこと、2-ヒドロキシイソフラボンからイソフラボンへの脱水には、基質特異的酵素が重要な役割をしていることが解明されてきたが、2-ヒドロキシイソフラボンからイソフラボンへの脱水に関与する酵素(2-ヒドロキシイソフラボンデヒドラターゼ)の詳細は不明であった。

【特許文献1】

国際公開第00/46356号パンフレット

【非特許文献1】

Akashi, T., Aoki, T. and Ayabe, S. (1999) Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavanoid skeleton in licorice. *Plant Physiol.* 121: 821-828.

【非特許文献2】

Steele, C.L., Gijzen, M., Qutob, D. and Dixon, R.A. (1999) Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavanoid biosynthesis in soybean. *Arch. Biochem. Biophys.* 367: 146-150.

【非特許文献3】

Jung, W., Yu, O., Lau, S. M., O'Keefe, D. P., Odell, J., Fader, G. and McGonigle, B. (2000) Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnol.* 18: 208-212.

【非特許文献4】

Dixon, R.A. and Steele, C.L. (1999) Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4: 394-400.

【非特許文献5】

Humphreys, J. M. and Chapple, C. (2000) Molecular 'pharming' with plant P450s. *Trends Plant Sci.* 5: 271-272.

【非特許文献6】

Feldmann, K.A. (2001) Cytochrome P450s as genes for crop improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 162-167.

【非特許文献7】

Yu, O., Jung, W., Shi, J., Croes, R.A., Fader, G.M., McGonigle, B. and Odell, J.T. (2000) Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiol.* 124: 781-793.

【非特許文献8】

Liu, C.J., Blount, J.W., Steele, C.L. and Dixon, R.A. (2002) Bottlenecks for metabolic engineering of isoflavone glycoconjugates in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14578-14583.

【非特許文献9】

Sankawa, U. and Hakamatsuka, T. (1997) Biosynthesis of isoflavone and related compounds in tissue cultures of *Pueraria lobata*. In Dynamic aspects of natural products chemistry. Molecular biological approaches. Edited by Ogura, K. and Sankawa, U. pp. 25-48. Kodansha/Harwood Academic, Tokyo.

【非特許文献10】

Hakamatsuka, T., Mori, K., Ishida, S., Ebizuka, Y. and Sankawa, U. (1998) Purification of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase from the cell cultures of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry* 49: 497-505.

【非特許文献11】

Akashi, T., Sawada, Y., Aoki, T. and Ayabe, S. (2000) New scheme of the biosynthesis of formononetin involving 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone but not daidzein as the methyl acceptor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:2276-2279.

【非特許文献12】

Akashi, T., Sawada, Y., Shimada, N., Sakurai, N., Aoki, T. and Ayabe, S. (2003) cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine:2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavanoid phytoalexin pathway. Plant Cell Physiol. 44:103-112.

【非特許文献13】

Ayabe, S., Akashi, T. and Aoki, T. (2002) Cloning of cDNAs encoding P450s in the flavonoid/isoflavanoid pathway from elicited leguminous cell cultures. Methods Enzymol. 357: 360-369.

【非特許文献14】

Nakamura, K., Akashi, T., Aoki, T., Kawaguchi, K. and Ayabe, S. (1999). Induction of isoflavanoid and retrochalcone branches of the flavonoid pathway in cultured *Glycyrrhiza echinata* cells treated with yeast extract. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 1618-1620.

【発明の開示】

本発明は、植物体においてイソフラボンを生産する工程に重要な役割を果たす脱水酵素を単離し、そのアミノ酸配列およびそれをコードするヌクレオチド配列を解明することを課題とする。より詳細には、本発明は、2-ヒドロキシイソフラバノンからイソフラボンへの脱水反応を触媒する2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのアミノ酸構造を決定し、それをコードする遺伝子を提供することを課題とする。さらにまた、本発明は、そのようにして得られた遺伝子をイソフラボンを含むイソフラボノイドの生産に応用することを課題とする。

上記の課題を解決するために、本発明者らは、まず、カンゾウ（フルモノネチン生産植物）およびダイズ（ダイゼイン生産植物）抽出物の2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼを調査し、種特異的な脱水酵素の存在を確認した。次に、生合成酵素のcDNAに関する新しい遺伝子クローニング法「機能発現分画スクリーニング」を用いて（非特許文献12）、カンゾウの2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン2,3-デヒドラターゼ（フルモノネチン合成酵素）

をコードする cDNA を単離した。さらに、配列情報から、基質特異性の異なる相似酵素、すなわちダイズの 2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン 2,3-デヒドラターゼ（ダイゼイン合成酵素）の cDNA を得た。

2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードする新規な遺伝子を取得したこと、該遺伝子を非マメ科の植物に導入し、イソフラボノイドの生産量を増大できる可能性を提供できた。

また、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードする遺伝子と IFS をコードする遺伝子を同時形質転換した微生物を用いてイソフラボノイドを生産できることを確認した。

さらに、本発明者らは、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのアミノ酸配列には、カルボキシルエステラーゼで知られているモチーフが含まれていることを見出した。相似タンパク質は高等植物に広く分布しており、天然産物の生合成における脱水の一部はこの酵素ファミリーによって介在されていることを示唆している。

すなわち、本発明は、カンゾウに含まれる 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ、特に、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン 2,3-デヒドラターゼ（フルモノネチル合成酵素）およびそれをコードするヌクレオチド配列に関するものである。カンゾウに含まれる 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼは、配列番号 1 に表わす 1-328 のアミノ酸配列を含んでいる。カンゾウの 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードする cDNA の配列は、配列番号 2 に示した。さらに、本発明は、該新規な遺伝子を発現する組換え体、該遺伝子を組み込んだ形質転換体にも関する。形質転換体としては、酵母、*E. coli* (大腸菌) が好ましく、該遺伝子を導入した *E. coli* K12 株は、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地中央第 6 所在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 FERM P-19257 (寄託日平成 15 年 3 月 20 日) として寄託した。そして、平成 16 年 3 月 15 日にブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管され、受託番号 FERM BP-08662 が付されている。

本発明は、さらにまた、該遺伝子あるいは該遺伝子と IFS をコードする遺伝子とを同時に組み込んだ酵母や *E. coli* などの微生物あるいは植物により、イソフ

ラボンを含むイソフラボノイドを生産する方法にも関するものである。形質転換に好ましい酵母は *Saccharomyces cerevisiae* BJ2168 株（ニッポンジーン社, Nippon Gene Co., Ltd.）、酵母用ベクターとしては、pYES2（インビトロゲン社, Invitrogen Corporation）、pESC-LEU（ストラタジーン社, Stratagene）、pESC-TRP（ストラタジーン社, Stratagene）、pESC-HIS（ストラタジーン社, Stratagene）などが挙げられる。

本発明は、また、ダイズに含まれる2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼである、2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ（ダイゼイン合成酵素）およびそれをコードするヌクレオチド配列にも関するものである。ダイズに含まれる2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼは、カンゾウに含まれる2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼと相似しているが、カンゾウのデヒドラターゼがイソフラバノンの4'-メトキシ体を基質とするのに対して、4'-ヒドロキシ体を基質とするものであって、配列番号3に表わす1-319のアミノ酸配列を含んでいる。ダイズの2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするcDNAの配列は、配列番号4に示した。さらに、本発明は、該新規な遺伝子を発現する組換え体、該遺伝子を組み込んだ形質転換体にも関するもので、形質転換体としては、酵母、*E. coli*（大腸菌）が好ましく、該遺伝子を導入した*E. coli*K12株は、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 FERM P-19256（寄託日平成15年3月20日）として寄託した。そして、平成16年3月15日にブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管され、受託番号 FERM BP-08661 が付されている。

本発明は、さらにまた、該遺伝子あるいは該遺伝子とIFSをコードする遺伝子とを同時に組み込んだ酵母や*E. coli*などの微生物あるいは植物により、イソフラボンを含むイソフラボノイドを生産する方法にも関するものである。形質転換に好ましい酵母は *Saccharomyces cerevisiae* BJ2168 株（ニッポンジーン社, Nippon Gene Co., Ltd.）、酵母用ベクターとしては、pYES2（インビトロゲン社, Invitrogen Corporation）、pESC-LEU（ストラタジーン社, Stratagene）、pESC-TRP（ストラタジーン社, Stratagene）、pESC-HIS（ストラタジーン社,

Stratagene) などが挙げられる。該遺伝子と IFS をコードする遺伝子とを同時に組み込んだ酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BJ2168 株はブダペスト条約に基づき日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地中央第 6 所在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターへ、受託番号 FERM BP-08663 (寄託日平成 16 年 3 月 15 日) として寄託した。

[図面の簡単な説明]

図 1 は、フラバノンからイソフラボノイドの生成経路を示す説明図である。

図 2 は、カンゾウ細胞の 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードする cDNA クローニングの説明図である。

図 3 A は、カンゾウおよびダイズの 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのアミノ酸配列を示す。

図 3 B は、カンゾウなどマメ科植物の遺伝子の分子系統樹を示す。(G. *echinata* Dehydratase = カンゾウ HIDM, Soybean TC98460 = ダイズ HIDH)

図 4 は、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ生成物の HPLC プロファイルを示す。

図 5 は、遺伝子発現レベルを示す RT-PCR 分析パターンを示す。

図 6 は、IFS と HIDH 共発現酵母(上段), IFS 発現酵母(中段), コントロール酵母(下段)をナリンゲニンを含む培地でインキュベートし、得られた抽出物の HPLC クロマトグラムを示す。

[発明の実施するための最良の形態]

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明において、カンゾウの 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼたんぱく質を HIDM、それをコードする遺伝子を *HIDM*、ダイズの 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼたんぱく質を HIDH、それをコードする遺伝子を *HIDH* と記することがある。

本発明は、配列番号 1 あるいは 3 で表わされるアミノ酸配列を実質的に有する 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼに関するが、本発明で、「アミノ

「酸配列を実質的に有する」とは、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ活性を有する限り、当該アミノ酸配列に欠失、置換、付加、挿入等の変異があるものを含むことを意味する。欠失、置換、付加、挿入されるアミノ酸の数は、例えば、1～20個、好ましくは1～10個、特に1～5個であり得る。特に、アミノ酸残基を同様の特性のアミノ酸残基で置換したものであり、典型的なかかる置換は、Ala、Val、Leu および Ile 間、Ser および Thr 間、Asp および Glu 間、Asn および Gln 間、Lys および Arg 間、Phe および Tyr 間の置換である。

さらに、本発明は、配列番号2あるいは4で表わされるヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に有するポリヌクレオチドに関するが、本発明で、「ヌクレオチド配列を実質的に有する」とは、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードする配列からなるポリヌクレオチドのほか、該配列と縮重による配列の相違、5'末端あるいは3'末端又はその両末端に適当な配列が付加されたポリヌクレオチドを含む意味である。

【実施例】

以下に、実施例によって、本発明を詳細に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。

<材料と方法>

本発明において用いた材料と手法は次のとおりである。

(1) 化学物質

ダイゼイン、ゲニステイン、ビオカニンAは、エクストラシンテース社 (Extrasynthèse) から、(RS)-ナリングニンおよび α -ニトロフェニル酪酸はシグマ社 (Sigma Corporation) から得た。フォルモノネチンは本発明者らの研究室のストックから入手した。

2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン（非特許文献13）および2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン（非特許文献12）は次のように調製した。すなわち、2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンは、CYP93C2 (IFS) を発現する酵母ミクロソーム、リクイリチゲニン (Liquiritigenin)、NADPHをインキュベートして、酢酸エチルで抽出、シリカゲルTLCで分離し、さらに逆相HPLC

Cで精製して調製した。2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンは、S-アデノシル-L-メチオニン (SAM)、2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン、組み換え2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン4'-O-メチルトランスフェラーゼ (H14'OMT) の反応混合物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲル TLC で分離、さらに HPLC で精製して調製した。

2,5,7,4'-テトラヒドロキシイソフラバノンは、CYP93C2 を発現する酵母のミクロソーム（非特許文献 1）と (RS)-ナリンゲニンおよび NADPHとのインキュベーションによって調製した。生成物 (Rf 0.30) は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) [Kieselgel F254 (メルク社, Merck Ltd.) ; 溶媒はトルエン:酢酸エチル:メタノール:石油エーテル=6:4:1:3]によって精製した。

(2) 植物材料

カンゾウの培養細胞 (Ak-1 系) は文献 (非特許文献 1) に従って、カンゾウの葉及び葉柄から作製した。 α -ナフタレン酢酸 (1 μ g/ml) 及び N6-ベンジルアデニン (1 μ g/ml) を含有する 1/2 濃度の Murashige-Skoog 培地 (0.3% (w/v) ジエランガムで固化) 中、12 時間光照射 (6,000 ルクス) / 12 時間暗所サイクルで培養し、エリシター処理した細胞より cDNA ライブラリーを構築した。懸濁培養物は 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (0.1 μ g/ml) とカイネチン (0.1 μ g/ml) 添加 Murashige-Skoog 培地中、暗所で維持した。エリシター処理は 0.2% (w/v 培養液) の酵母抽出物 (インビトロゲン社, Invitrogen Corporation) を使用して行った (非特許文献 14)。

ダイズの種子 (*Glycine max* L. 中生枝豆 : トホク社, Tohoku Ltd.) は、水に 24 時間浸漬し、コニカルピーカー内の濾紙の上に撒いた。ダイズの実生は、明 12 時間/暗 12 時間という条件で室温で 1 週間成長させた。

(3) 無細胞抽出物の調製

操作はすべて 4°Cで行った。エリシター処理 (24 時間) 後のカンゾウ細胞 (10 g) あるいは 1 週齢のダイズの実生 (10 g) は、10%スクロースおよび 14 mM 2-メルカプトエタノールを含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 10 ml お

および海砂（2.5 g）を用いて乳鉢でホモジエナライズした。ホモジエネートはガーゼで濾過し、10,000gで10分間遠心分離した。上清を2.5gのDowex 1-X2（100 mM リン酸カリウム緩衝液で平衡化、pH 7.5）と混合し、20分間放置した。濾過によって得られた溶液は、硫酸アンモニウムを用いて分画し、30%～80%飽和画分を Sephadex G-25 カラムで脱塩し、10%スクロースおよび14 mM 2-メルカプトエタノールを含む100 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.5）に溶解しアッセイに用いた（約600 μg タンパク質/ml）。

（4）2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのアッセイ

2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンまたは2,5,7,4'-テトラヒドロキシイソフラバノン（各5 nmol）を含む2-メトキシエタノールに酵素調製液を加え（総容量：100 μl）、30°Cで10分間インキュベートした。

2,5,7-トリヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンデヒドラターゼ（ビオカニンA合成酵素）のアッセイは以下のように行った。2-メトキシエタノールに溶解した2,5,7,4'-テトラヒドロキシイソフラバノン（10 nmol）を、カンゾウ HIDM（1 μg）、1 μmol S-アデノシル-L-メチオニン（SAM）とともに30°Cで15分間インキュベートした。

濃縮した酢酸エチル抽出物を組換えカンゾウ HIDM（1 μg）と30°Cで10分間インキュベートした。混合物の酢酸エチル抽出物を、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した。ダイゼインおよびフルモノネチン分析のHPLCは、Capcell pak C18 MG カラム（4.6×150mm；資生堂社，Shiseido Co., Ltd.）を用いて40°C（流量0.8ml/min）で行った（非特許文献12）。溶出溶媒はメタノールと3%酢酸水を用いた。40分の間に35%～55%になるように直線グラジエントで溶出させた。5-ヒドロキシイソフラボンは、Capcell pak C18 MG カラム（4.6×150 mm；資生堂社，Shiseido Co., Ltd.）を用いて50%メタノール水溶液（ゲニステインの場合）または55%メタノール水溶液（ビオカニンAの場合）によって40°C（流量0.8 ml/分）で分析した。

精製した組換えタンパク質（約 10 ng タンパク質）とカンゾウおよびダイズ（約 10 μg タンパク質）の無細胞抽出物を用いて比活性を測定した。イソフラボン濃度は、ダイゼイン、フォルモノネチン、ゲニステインの標準試料の HPLC ピーク面積から算出した。

（5）カンゾウ細胞の 2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードする cDNA (*HIDM*) のクローニング

タンパク質の発現および大腸菌の粗抽出物の調製は既報のように行つた（非特許文献 12）。

酵母抽出物でエリシター処理（6 時間および 12 時間）したカンゾウ細胞から構築した cDNA 発現ライブラリー（非特許文献 12）をスクリーニングに使用した。

カンゾウ λ ZapII cDNA ライブラリーを Exassist ヘルパーファージ（ストラタジーン社, Stratagene Corporation）と *E. coli* DH5α F' IQ（インビトロゲン社, Invitrogen Corporation）を用いて *in vivo excision* によりファージミドに変換した。

ファージミドは DH5α F' IQ に導入され、*E. coli* 細胞は、Luria-Bertani (LB) / アンピシリン (50 μg/ml) 寒天プレート上で増殖した。母プレートから LB/アンピシリン培養液中に約 30,000 の大腸菌 (*E. coli*) 形質転換体をそれぞれ含む 5 つの独立した cDNA 分画プールを調製した。5mM IPTG を含む LB 液体培地で培養し、細胞を回収後、粗酵素液を調製した。

2-メトキシエタノール 2 μl に溶解した 2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン (0.4 nmol) に組換えカンゾウ *H14'OMT* (50 ng) を加え（非特許文献 12）、0.4 nmol S-アデノシル-L-[メチル-¹⁴C]メチオニン ([¹⁴C]SAM、2.26 GBq/mmol、アマシャム バイオサイエンス社 Amersham Biosciences Corporation) の存在下で 30°C で 3 分間ブレインキュベートした（総容量 : 50 μl）。次に、大腸菌プールの粗抽出物 (100 μl) を混合物に加え、30°C でさらに 10 分間インキュベートした。酢酸エチルを加えて反応を停止させた後、混合物の酢酸エチル抽出物をシリカゲル TLC [LK6DF (ワットマン社, Whatman Ltd.) ; 溶媒はクロロホルム:

アセトン:25%アンモニア水=70:29:1 ; 2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン (Rf 0.15) 、フォルモノネチン (Rf 0.30)]で展開し、画像分析装置 (Typhoon 8600、アマシャム バイオサイエンス社、Amersham Biosciences Corporation) によって分析した。 [¹⁴C] フォルモノネチンを生成した陽性プールを次のスクリーニングのために選択し、小さいサイズ (約 3,000 クローン/プール) の 10 プールに分画した。陽性プールの分画と検定は 4 回繰り返し、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンデヒドラターゼ活性を示すクローン (*HIDM*) を単離した。(図 2 参照)

プラスミドを回収し、オートシーケンサー (LIC-4000、アロカ社、Aloka Co., Ltd.) を用いてスクレオチド配列を決定した。

(6) *HIDM* と相同のダイズ cDNA (*HIDH*) のクローニング

ポリ (A) + RNA を RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社、Qiagen Ltd.) を用いてダイズの実生から単離し、cDNA を Ready-To-Go T-Primed First Strand Kit (アマシャムバイオサイエンス社、Amersham Biosciences Corporation) を用いて合成した。*NdeI* または *BamH*I 部位 (下線で示す) を含む 2 つの PCR 特異プライマーは、開始コドンおよび終止コドン配列を指定するダイズ EST の TC98460 のコード領域から設計した (TC98-Fow、GTCATATGGCGAAGGAGATGTGAA (配列番号 5) ; TC98-Rev、AGGGATCCATCAAACCAAGAAAAGA (配列番号 6))。プライマーおよび鑄型としてダイズ cDNA を用いた逆転写 (RT) -PCR によって得られた cDNA (*HIDH*) は、pT7Blue T-ベクター (ノバゲン社、Novagen Ltd.) に組み込み、スクレオチド配列を決定した。

(7) 大腸菌におけるカンゾウ *HIDM* およびダイズ *HIDH* の異種発現

NdeI または *BamH*I 部位 (下線で示す) を含む 2 つのプライマーは、カンゾウ *HIDM* のコード領域から設計した (GeDchy-F、GTCATATGGCTTCTAACCTCAAC (配列番号 7) ; GeDehy-R、CTGGGATCCTCAAACAAGGAAGGAAG (配列番号 8))。カンゾウ *HIDM* から得られた PCR 生成物の *NdeI-BamH*I フラグメントは、pET28a (ノバゲン社 Novagen Ltd.) の対応する部位にクローニングした。さらに、クローニング

したダイズ cDNA (*HIDH*) の *NdeI-BamH* フラグメントは、pET28a の対応する部位にもサブクローニングした。遺伝子組換え 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの発現および精製は、次の方法で行った（非特許文献 1 2）。各ベクターと一緒に形質転換された *E. coli* BL21 (DE3) 細胞は 30°C で 20 ml の 50 μg/ml カナマイシンあるいはアンピシリン添加の LB/アンシピリン培地で OD₆₀₀=0.4 まで培養された。IPTG が最終濃度 1.0 mM になるように添加され、6 時間 30°C でインキュベートされた。カンゾウ *HIDM* およびダイズ *HIDH* は、HisTrap Kit (アマシャムバイオサイエンス社, Amersham Biosciences Corporation) を用いて *HIDM* および *HIDH* 発現 *E. coli* の粗抽出物から精製された。

(8) 2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ(IFS)と2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼを共発現させた組換え酵母の調製

マメ科カンゾウの IFS (CYP93C2) を酵母で発現させるためのベクター (pYES-CYP93C2) は非特許文献 1 と特許文献 1 に記載したもの用いた (CYP93C2 遺伝子のコード領域を、酵母発現ベクター (pYES2, インビトロゲン社, Invitrogen Corporation) のガラクトース誘導性プロモータ GAL1 の下流の *KpnI* と *EcoRI* サイトに組み込んだもの)。

ダイズの 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ (*HIDH*) を酵母で発現させるためのベクター (pESC-HIDH) は以下のようにして作成した。*Apal*、*Xhol* 部位（下線で示す）を付加した 2 種のプライマー [*HIDH-F1* (5' - GGGGCCCGATCCATGGCGAAGGAGATAGTGAAAG-3' (配列番号 9))，*HIDH-R1* (5' - GGGAGCTCGAGTCAAACCAGAGAAAAGAACGCC-3' (配列番号 10))] を、ダイズ 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ (*HIDH*) のコード領域から設計した。プライマーと KOD ポリメラーゼ (東洋紡, Toyobo Co., Ltd.)、さらに鑄型としてダイズ *HIDH* cDNA を用いて PCR (98°C で 15 秒, 60°C で 15 秒, 74°C で 30 秒を 15 サイクル) を行った。増幅産物を *Apal*、*Xhol* で処理し、酵母発現ベクター (pESC-Leu, ストラタジーン社, Stratagene) のガラクトース誘導性プロモータ GAL1 の下流の *Apal* と *Xhol* サイトに組み込んだベクター (pESC-HIDH) を作製した。

エレクトロポレーション装置 (Celllect Duo, サーモエレクトロン社, Thermo Electron Corporation) を用いて酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BJ2168 株 (a: prc1-407, prb1-1122, pep4-3, leu2, trp1, ura3-52) (ニッポンジーン社, Nippon Gene Co., Ltd.) を形質転換した。エレクトロポレーションはサーモエレクトロン社 (Thermo Electron Corporation) が推奨する方法に従って行った。形質転換体は、yeast nitrogen base without amino acids (6.7 g/l, インビトロゲン社, Invitrogen Corporation)、グルコース (20 g/l), トリプトファン (20 mg/l), 寒天 (20 g/l) を含む培地で選択した。以下の 3 種の組換え酵母を作成した：(1) コントロール酵母 (pYES2 と pESC-Leu を BJ2168 株に導入)、(2) IFS 発現酵母 (pYES-CYP93C2 と pESC-Leu を BJ2168 株に導入)；(3) IFS と 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ共発現酵母 (pYES-CYP93C2 と pESC-HIDH を BJ2168 株に導入)

(9) カルボキシルエステラーゼ活性の測定

組換えカンゾウ HIDM およびダイズ HIDH タンパク質の特異的カルボキシルエステラーゼ活性は、150 mM NaCl および 750 nmol *p*-ニトロフェニル酪酸を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0) 1.5 ml 中における吸光度 400 nm で 30°C で測定した *p*-ニトロフェノールの生成速度から算出した (Heymann 1981)。市販のブタ肝臓カルボキシルエステラーゼ (シグマ社, Sigma Corporation) を陽性対照として用いた。熱変性 (100°C、10 分間) させたカンゾウ HIDM、ダイズ HIDH、ブタ肝臓カルボキシルエステラーゼタンパク質を陰性対照として分析した。

(10) RT-PCR 分析

懸濁培養したカンゾウ細胞は、酵母抽出物で処理し、3、6、12、24、48 時間後に収集した (非特許文献 1)。mRNA は Straight A's mRNA 単離システム (ノバゲン社, Novagen Ltd.) を用いて抽出し、cDNA を合成した。RT-PCR には、カンゾウ HIDM, IFS (非特許文献 1, 2)、H14'OMT (非特許文献 1, 2) から設計した特異プライマーを使用した。反応は 94°C で 1 分間の変性によって開始し、3 工程のインキュベーション (94°C、1 分間；55°C、1 分間；72°C、1 分間) を 30 サ

イクル繰り返した。生成物は、1.2% (w/v) アガロースゲルの電気泳動にかけ、臭化エチジウムで染色した。

上記の材料および方法によって得られた本発明の結果を示す。

(1) カンゾウ細胞およびダイズの実生における 2-ヒドロキシソフラバノン
デヒドラターゼ活性

カンゾウ細胞はエリシター処理後にメティカルピン (4'-メトキシソフラボノイド、図 1 参照) を蓄積するが、4'-ヒドロキシソフラボノイドは蓄積しない (Nakamura et al. 1999)。ダイズはイソフラボンの、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン配糖体を産生することが知られており、それらはいずれも 4'-ヒドルキシル化体である (Dewick 1986, Dewick 1993, Aussencac 1998)。したがって、カンゾウ細胞およびダイズの実生の抽出物には、それぞれ適切に置換された 2-ヒドロキシソフラバノンからフォルモノネチンおよびダイゼインを生成する活性が存在すると推測される。HPLC を用いて活性を調べた結果を表 1 に示す。

表 1

カシワヒドリとダイズHIDHの比活性

| 基質 | 生成物 | カシワ | | ダイズ | |
|---------------------------------------|------------|------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|
| | | 粗抽出物(c) (pkatal/mg) | 粗換えたんばく質(d) (nkatal/mg) | 粗抽出物(c) (pkatal/mg) | 粗換えたんばく質(d) (nkatal/mg) |
| 2,7-ジヒドロキシ-4'-メチル 1'-(2,4-ジブチル)ハボン | フルモノネチン | 123.0±8 | 52.1±1.5 | 97.4±10 | 0.90±0.1 |
| 2,5,7,4'-テトラヒドロキシ 1'-(2,4-ジブチル)ハボン | ケニステイン | —(e) | —(e) | 19.6±3 | 3.55±0.6 |
| 2,7,4'-トリヒドロキシリフラ ハボン | ダイセイジン | 0.8±0.03 | 0.70±0.08 | 197.3±15 | 43.6±4 |
| p-ニトロフェニール酛酸 | p-ニトロフェノール | —(e) | 0.32±0.07(f) | —(e) | 7.20±0.4(f) |
| (e) 平均±SD(3実験) | | | | | |

(b) 比活性はイソフランとp-ニトロフェノール生成物の生成量から計算した。

(c) 0.2%酵母抽出物で24時間エリシター処理したカシワの沈殿物
アンモニウム(30%~80%飽和)沈殿物

(d) 精製粗換えたんばく質

(e) 未解析

(f) 热処理(100°C、10分)されたたんばく質とp-ニトロフェニル酛酸とのアッセイでは、酵素的脱水活性を示さなかつた。

表1から分かるとおり、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンをカンゾウの無細胞抽出物とインキュベートした場合では、フォルモノネチンが生成した。カンゾウ抽出物による2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンからのダイゼインの生成も少量認められたが、その活性はフォルモノネチンの生成より約160倍低かった。

ダイズ実生の無細胞抽出物では、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン（フォルモノネチンを产生）および2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン（ダイゼインを产生）からほぼ1：2のフォルモノネチンとダイゼインの生成が検出された。さらに、ダイズ抽出物は、ダイゼインの生成の約1/10のレベルで、2,5,7,4'-テトラヒドロキシイソフラバノンからのゲニステインの生成を触媒した。

一方、2-ヒドロキシイソフラバノンの自発的な脱水は、中性緩衝液（pH 7.5）における50 μMの基質濃度による実験条件では無視し得るものであった。これらの結果は、植物細胞でイソフラボンを形成する2-ヒドロキシイソフラバノンの脱水は酵素触媒反応であることを強く示唆している。さらに、カンゾウおよびダイズの2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの基質特異性は異なることが推定される。

（2）機能発現分画スクリーニングによるカンゾウの2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼcDNAの取得

2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンからフォルモノネチンへの変換の特異的かつ高感度の検出は、酵母の遺伝子組換えIFSによって調製した精製2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン（非特許文献1）、[¹⁴C]SAMおよびアフィニティ精製したN末端に6個のヒスチジンを含む組換えカンゾウH14'OMT（非特許文献12）を組み合わせて用い、検定前に[¹⁴C]-2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンを產生することによって可能になった。酵母抽出物で処理したカンゾウ細胞のcDNA発現ライブラリー（非特許文献12）を用いてデヒドラターゼのcDNAのスクリーニングを行った。最初のスクリーニングは、5つのcDNAプール（形質変換体30,000/プール）で実施した。大腸菌プールの抽出物は、

[¹⁴C]-2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンを產生させた上記の混合物と反応させ、反応混合物の酢酸エチル抽出物を TLC オートラジオグラフィーによって分析した。2つのプールが [¹⁴C] フォルモノネチンを产生することが判明し、任意に選択した陽性プールの一方を小さいサイズ（約 3,000 クローン/プール）の 10 プールに分画した。タンパク質の発現および分析を再び行い、10 プールのうちの 1 つの陽性プールを同定した。陽性プールの分画および分析を繰り返した。10 プールのうちの 1 つの陽性プールを、3 回目（約 300 クローン/プール）、4 回目（30 クローン/プール）および 5 回目（3 クローン/プール）のスクリーニングで繰り返し同定した。最後に、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンデヒドラターゼ活性を示す单一の大腸菌クローンを単離した（図 2 参照）。

酵素をコードする cDNA を回収し、シーケンサーを用いて配列決定を行った。HIDM (2-hydroxyisoflavanone dehydratase methoxy type) の cDNA は 1,178 bp のヌクレオチドを有し、328 のアミノ酸をコードしていた（図 3A）。タンパク質-タンパク質 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 検索では、カンゾウの HIDM の推定アミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) の推定タンパク質と 40% の同一性 (受入れ番号 At1g47480、AT3g48690、At3g48690)、*Nicotiana tabacum* (タバコ) hsr203J と 34% の同一性 (受入れ番号 X77136) (Pontier et al 1994)、エンドウマメ E86 と 31% の同一性 (受入れ番号 AB026296) (Ichinose et al. 2001)、*Archaeoglobus fulgidus* (好熱性硫黄細菌) のカルボキシルエステラーゼと 32% の同一性 (受入れ番号 1JJIA) (Manco et al. 2000) を示すことが明らかになった。また、カンゾウ HIDM はカルボキシルエステラーゼで記録された保存配列のモチーフを有していた (N 末端から約 40~180 アミノ酸)。

リパーゼおよびエステラーゼとともにオキシアニオンホールを形成する保存配列 (His 85-Gly 86-Gly 87: 図 3A において枠で囲んだ配列) は、カルボキシルエステラーゼのモチーフに存在していた (Contreras et al. 1996, Laurell et al. 2000, Hosokawa 2002)。カンゾウ HIDM タンパク質では、一般的なリパーゼおよびエステラーゼの触媒トライアードに保存された Ser 残基 (Osterlund et al 1996, Contreras et al. 1996, Manco et al. 2000, Hosokawa 2002) が Thr

残基に置換されているものの、仮想の触媒トライアード（Thr 173、Asp 272 および His 304）がカルボキシルエステラーゼモチーフの外側に認められた。図 3 Aにおいて、仮想の触媒トライアード（Thr 173、Asp 272 および His 304）には * を付した。

（3）マメ科植物ライブラリーにおけるカンゾウデヒドラターゼの相同 cDNA の検索

ダイズ (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/gmgi/>)、*Medicago truncatula* (タルウマゴヤシ) (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/mtgi/>)、*Lotus japonicus* (ミヤコグサ) (<http://www.kazusa.or.jp/cn/plant/lotus/EST/>) (Asamizu et al. 2000) のエクスプレスドシーケンスタグ (EST) データベースの検索から、これらの植物にカンゾウ *HIDM* と相同（アミノ酸同一性 > 50%）の cDNA が存在することが明らかになった。しかし、これらの配列はすべて仮想タンパク質としてのみ注釈が付けられていた。分子系統樹では、ダイズ BM177194、*L. japonicus* TC3332、*M. truncatula* TC43540 タンパク質が、カンゾウのデヒドラターゼと同じ分枝を形成（アミノ酸レベルでの同一性 > 80%）することが示された（図 3B）。ダイズ TC98460 タンパク質は 4 種類のタンパク質と > 60% の同一性を有し、*M. truncatula* BG456496 と密接な分枝を形成した（図 3B）。

（4）カンゾウとダイズの遺伝子組換え 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの特性決定

ダイズの EST 配列 TC98460 は、予測された開始コドンおよび終止コドンを有している。cDNA のコード領域をダイズ実生から RT-PCR でクローニングし、*HIDH*(2-hydroxyisoflavanone dehydratase hydroxy type) と命名した。

カンゾウ *HIDM* およびダイズ *HIDH* は大腸菌で発現させ、N 末端に 6 つのヒスチジン残基を持つ組換えタンパク質を精製し、2-ヒドロキシイソフラバノンに対する活性を測定した。図 4A に示すように、カンゾウ *HIDM* と 2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンとのインキュベーションによってフォルモノネチンが生成された。生成物（フォルモノネチン）の同定は標準サンプルとの Rt 値の

比較および電子衝撃質量分析法 (*m/z* 268 の分子イオンピーク、*m/z* 132 の retro-Diels-Alder フラグメントピーク) によって確認した。さらに、カンゾウ HIDM によって 2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンから少量のダイゼインが產生された。カンゾウ HIDM の 2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンに対する比活性は 2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンに対するものより 74 倍高く、組換えタンパク質の生化学的特性がカンゾウ無細胞抽出物のものと一致することを示している（表 1）。

組換えダイズ HIDH を、2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンと 2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンを用いてアッセイすると HPLC 上で、ダイゼインとフォルモノネチンのピークが現われることを確認した（図 4A）。イソフラボンの化学構造は電子衝撃質量分析法によって再確認した。さらに、ダイズ HIDH は、2,5,7,4'-テトラヒドロキシイソフラバノンからのゲニステインの生成を触媒した（図 4A）。表 1 に示すように、HIDH の比活性は 2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンに対して最も高かったが、別の 4'-ヒドロキシル化された基質に対しては比較的低く（約 1/10）、4'-メトキシ基を持つ基質に対してはきわめて低かった。

さらに、カンゾウ HI4'OMT と 2,5,7,4'-テトラヒドロキシイソフラバノンおよび SAM とのインキュベーションによって得られた 2,5,7-トリヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンと予想される化合物をカンゾウ HIDM とインキュベートした場合には、HPLC でビオカニン A が検出された（図 4B）。

（5）遺伝子組換えカンゾウおよびダイズの 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのカルボキシルエステラーゼ活性

α -ニトロフェニル酪酸は、カルボキシルエステラーゼアッセイで一般に用いられる基質である。遺伝子組換えカンゾウおよびダイズのデヒドラターゼは α -ニトロフェニル酪酸に弱い活性を示した（表 1）。これに対して、ブタ肝臓カルボキシルエステラーゼは 2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンを脱水しなかった（表 1）。

(6) カンゾウ細胞のフォルモノネチニン経路における遺伝子発現

RT-PCR 分析から、カンゾウ細胞の *HIDM*、*H14'OMT* および *IFS* の転写レベルは酵母抽出物による処理から 6~12 時間後に増加することが明らかになった（図 5）。

(7) 2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ(IFS)と2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼを共発現させた組換え酵母でのイソフラボン生産

前記 2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ(IFS)と2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼを共発現させた組換え酵母の調製の項で説明した 3 種の組換え酵母、すなわち、(1) コントロール酵母 (pYES2 と pESC-Leu を酵母 BJ2168 株に導入)、(2) IFS 発現酵母 (pYES-CYP93C2 と pESC-Leu を酵母 BJ2168 株に導入)、(3) IFS と 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ共発現酵母 (pYES-CYP93C2 と pESC-HIDH を酵母 BJ2168 株に導入) を用いてイソフラボン生産能を比較した。

3 種の酵母をそれぞれ 1.5 ml の SD 最小液体培地 [yeast nitrogen base without amino acids (6.7 g/l)、グルコース (20 g/l)、トリプトファン (20 mg/l)] で一晩振とう培養 (28°C) した。遠心により菌体を回収後、1 μg ヘミンを含む 3 ml の YPG 液体培地 [イーストエキストラクト (10 g/l)、ペプトン (20 g/l)、ガラクトース (20 g/l)] に菌体を懸濁し、一晩培養してタンパク質発現を誘導させた。遠心により菌体を回収後、50 μg ナリンゲニン (5 μl tween 80 と 5 μl エタノールに溶解) を含む 0.5 ml YPG 液体培地に菌体を懸濁し、一晩培養した。培養液にガラスピーズを加えて細胞を破碎し、酢酸エチルで抽出した。抽出液を乾固後、メタノールに溶解し、HPLC [カラム： CAPCELL PAK C18 MG column (4.6 x 150 mm; 資生堂社, Shiseido Co., Ltd.); 40°C; 0.8 ml/min; 溶媒 30%メタノール (0 分) ~ 50%メタノール (30 分) になるように直線グラジェント] で分析した。ゲニステイン標品のピーク面積を基に、各サンプルのゲニステイン量を求めた。

その結果、IFS と 2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼを共発現させた組換え酵母 (3) と、IFS を単独で発現させた組換え酵母 (2) では、HPLC 上でゲ

ニステインと 2,5,7,4' -テトラヒドロキシイソフラバノンの生成が確認された。コントロール酵母（1）では両化合物の生成は見られなかった。IFS と 2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼを共発現させた酵母（3）ではゲニステインを $3.2 \pm 0.2 \mu\text{g}$ （3回の実験）生産した。IFS を単独で発現させた組換え酵母でのゲニステイン生成量は $0.8 \pm 0.1 \mu\text{g}$ （3回の実験）であり、IFS と 2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼを共発現させるとイソフラボン生産量が増加することがわかった（図 6 参照）。

以上の結果から、次のことが明らかになった。

本発明では、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードする cDNA、カンゾウ *HIDM* ダイズ *HIDH* をクローニングした。*HIDM* および *HIDH* は 4'-メトキシルおよび 4'-ヒドロキシル置換基を有する 2-ヒドロキシイソフラバノンに対して異なった基質特異性を示す。これらの酵素は、命名法に各酵素の最も好ましい基質を用いて、カンゾウの 2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン-2,3-デヒドラターゼ（フォルモノネチニン合成酵素）およびダイズの 2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン-2,3-デヒドラターゼ（ダイゼイン合成酵素）と呼ぶことができる。重要なことは、基質特異性は各植物種に含まれるイソフラボンの構造（さらには生合成経路の下流のイソフラボノイド）を反映していることである。したがって、植物細胞の 2-ヒドロキシイソフラバノンからのイソフラボンの生成は酵素に依存している可能性が非常に高い。

遺伝子組換えカンゾウ *HIDM* タンパク質による 2-ヒドロキシイソフラバノン脱水酵素反応の比活性は、カンゾウの粗抽出物よりも約 400~900 倍高く、遺伝子組換えタンパク質および粗抽出物はいずれも 2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンよりも 2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンに対して極めて高い選択性を示した（表 1 参照）。これは、粗抽出物の主要な活性が *HIDM* タンパク質にあることを強く示唆している。さらに、誘導したカンゾウ細胞の *HIDM* mRNA が IFS と *H14'OMT* の mRNA と同等に蓄積することは、*HIDM* がフォルモノネチニンの生合成に関与していることを示唆している。

一方、ダイズ抽出物は2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラボノンおよび2,7,4'-トリヒドロキシイソフラボノンに対する脱水活性を約1:2の割合で触媒した。これに対して、遺伝子組換えダイズHIDHタンパク質の活性は2-ヒドロキシイソフラボノンの4'-ヒドロキシル化体にきわめて特異的であった（表1参照）。これらのことから、ダイズの4'-ヒドロキシル化イソフラボンの生成はHIDHに起因している可能性が高い。

本発明で、さらに興味深い所見は、2-ヒドロキシイソフラボノンデヒドラターゼは加水分解酵素ファミリーのカルボキシルエステラーゼに分類される配列を有するタンパク質であるということである。実際に、ダイズHIDHは α -ニトロフェニル酪酸に対して弱いカルボキシルエステラーゼ活性を有していた（ブタ肝臓酵素の約1/50）（表1参照）。本発明は、このファミリーのタンパク質が脱水を触媒することを最初に実証したものである。

P. lobata（クズマメ）で報告された2-ヒドロキシイソフラボノンデヒドラターゼの特性はダイズHIDHの特性と一致する（Hakamatsuka et al. 1998）。*P. lobata*のタンパク質の分子量（38 kDa）はダイズHIDHの計算値（35,115）と近い。さらに、2,7,4'-トリヒドロキシイソフラボノンに対する*P. lobata*のデヒドラターゼの比活性（56.8 mkatal/kg タンパク質）は、遺伝子組換えダイズHIDHの活性（43.6 mkatal/mg）とほぼ同様である。非常に興味深いことに、*P. lobata*のタンパク質のHis残基は活性に重要であることが報告されており（Hakamatsuka et al. 1998）、Hisはカルボキシルエステラーゼの触媒トライアードのアミノ酸の1つである（Satoh and Hosokawa 1995, Wei et al. 1999）。したがって、*P. lobata*の2-ヒドロキシイソフラボノンデヒドラターゼはカルボキシルエステラーゼファミリーのタンパク質でもあると考えられる。

いくつかのデヒドラターゼ遺伝子/タンパク質は、数種類の植物から特性が決定されている。これらにはデヒドロキナ酸デヒドラターゼ（Deka et al. 1994）、 δ -アミノレブリン酸デヒドラターゼ（Kaczor et al. 1994）、イミダゾールグリセロールリン酸デヒドラターゼ（Tada et al. 1994）、アレンオキシド合成酵素（Song et al. 1993）が含まれる。しかし、これらのデヒドラターゼと

HIDM/HIDHとの間ではヌクレオチドおよびアミノ酸配列の有意な相同性は認められていない。

HIDM/HIDHとある程度相同のカルボキシルエステラーゼモチーフを有するタンパク質は植物界に広く分布している。さらに、植物性天然産物の生合成では酵素の特性が決定されていない多くの脱水反応があり、たとえばプロカルパン骨格を生じる2'-ヒドロキシイソフラバン-4-オールの脱水環化がある (Bless and Barz 1988, Guo et al. 1994a, Guo et al. 1994b)。ヒヨコマメおよびダイズのそれぞれのイソフラボノイドの生合成では各植物のミクロソームの実験から、メチレンジオキシ環の生成およびフェノール環のプレニル置換基の環化はP450によるものである (Clemens and Barz 1996, Welle and Grisebach 1988)。しかし、P450とともにデヒドラターゼがこれらの反応に関与している可能性もあり、その酵素タンパク質はカルボキシルエステラーゼファミリーに分類されるかもしれない。また、触媒機能が未同定のこの種のタンパク質をコードするいくつかの植物遺伝子が病原体に反応して誘導されることが報告されている (Pontier et al. 1994, Walden et al. 1999, Ichinose et al. 2001, Tronchet et al. 2001, Bezier et al. 2002)。これらは、防御に関わる化合物の生合成に関与するデヒドラターゼであることも考えられる。

2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ遺伝子の同定は、マメ科および非マメ科植物の代謝エンジニアリングにきわめて重要である。これまでのところ、非マメ科植物でイソフラボノイドを生成するために、ダイズ IFS を過剰発現する形質転換型 *Arabidopsis thaliana* および *Nicotiana tabacum* が構築されているが (非特許文献3、非特許文献7、非特許文献3)、形質転換体のイソフラボノイドの生産性は満足できるものではない。典型的な場合では、シロイヌナズナの生重量1 gあたり約2 ng～4 ngのゲニステインが生産されるのに対して (非特許文献7、非特許文献8)、ダイズ種子の乾重量1 gあたり約4 mg～10 mg相当のイソフラボン (Aussenac et al. 1998) およびルーピン実生の生重量1 gあたり約3 mgのイソフラボンが生産される (Katagiri et al. 2000)。フラバノンから2-ヒドロキシイソフラバノンへの代謝フローと3-ヒドロキシフラバノンに至る別のフローとの競合は、形質転換型シロイヌナズナにおけるイソフラボン生

産のボトルネックになると思われ、実際に IFS で形質変換したシロイヌナズナのフラavanon 3-ヒドロキシル化酵素変異体におけるイソフラボン生産は 6~31 倍に増加している (Liu et al. 2002)。

IFS を単独で発現させた組換え酵母と比べて、IFS と H1DH を同時に発現させた組換え酵母ではイソフラボン生産量が増加したことから、非マメ科植物で IFS と H1DH を同時に発現させることにより、イソフラボン生産量が増大する可能性も期待できる。

さらに、H1DH および H1DM を導入遺伝子に用いた遺伝子工学によって、マメ科植物のイソフラボノイド経路を修正することも実現可能である。

<References>

Akashi, T., Aoki, T. and Ayabe, S. (1999) Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavanoid skeleton in licorice. *Plant Physiol.* 121: 821-828.

Akashi, T., Sawada, Y., Aoki, T. and Ayabe, S. (2000) New scheme of the biosynthesis of formononetin involving 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone but not daidzein as the methyl acceptor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 2276-2279.

Akashi, T., Sawada, Y., Shimada, N., Sakurai, N., Aoki, T. and Ayabe, S. (2003) cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine: 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavanoid phytoalexin pathway. *Plant Cell Physiol.* 44: 103-112.

Aoki, T., Akashi, T. and Ayabe, S. (2000) Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *J. Plant Res.* 113: 475–488.

Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S. and Tabata, S. (2000) Generation of 7137 non-redundant expressed sequence tags from a legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 7: 127–130.

Aussenac, T., Lacombe, S. and Dayde, J. (1998) Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1480S–1485S.

Ayabe, S., Akashi, T. and Aoki, T. (2002) Cloning of cDNAs encoding P450s in the flavonoid/isoflavonoid pathway from elicited leguminous cell cultures. *Methods Enzymol.* 357: 360–369.

Basarab, G. S., Steffens, J. J., Wawrzak, Z., Schwartz, R. S., Lundqvist, T. and Jordan, D. B. (1999) Catalytic mechanism of scytalone dehydratase: site-directed mutagenesis, kinetic isotope effects, and alternate substrates. *Biochemistry* 38: 6012–6024.

Baudouin, E., Charpenteau, M., Roby, D., Marco, Y., Ranjeva, R. and Ranty, B. (1997) Functional expression of a tobacco gene related to the serine hydrolase family — esterase activity towards short-chain dinitrophenyl acylesters. *Eur. J. Biochem.* 248: 700–706.

Bezier, A., Lambert, B. and Baillieul, F. (2002) Cloning of a grapevine Botrytis-responsive gene that has homology to the tobacco hypersensitivity-related hsr203J. J. Exp. Bot. 53: 2279-2280.

Bless, W. Barz, W. (1988) Isolation of pterocarpan synthase, the terminal enzyme of pterocarpan phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of *Cicer arietinum*. FEBS Lett. 235: 47-50.

Clemens, S. and Barz, W. (1996) Cytochrome P450-dependent methylenedioxy bridge formation in *Cicer arietinum*. Phytochemistry 41: 457-460.

Contreras, J.A., Karlsson, M., Osterlund, T., Laurell, H., Svensson, A. and Holm, C. (1996) Hormone-sensitive lipase is structurally related to acetylcholinesterase, bile salt-stimulated lipase, and several fungal lipases. Building of a three-dimensional model for the catalytic domain of hormone-sensitive lipase. J. Biol. Chem. 271: 31426-31430.

Deka, R.K., Anton, I.A., Dunbar, B. and Coggins, J.R. (1994) The characterisation of the shikimate pathway enzyme dehydroquinase from *Pisum sativum*. FEBS Lett. 349: 397-402.

Dewick, P.M. (1986) Isoflavonoids. In The Flavonoids. Advances in Research since 1980, Edited by Harborne, J.B. pp. 125-209, Chapman and Hall, London.

Dewick, P.M. (1993) Isoflavonoids. In The Flavonoids. Advances in Research since 1986 Edited by Harborne, J.B. pp. 117-238, Chapman and Hall, London.

Dixon, R. A. (2002) Genistein. *Phytochemistry* 60: 205–211.

Dixon, R. A. (1999) Isoflavonoids: biochemistry, molecular biology, and biological functions. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Volume 1. Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives. Edited by Sankawa, U. pp. 773–823. Elsevier, Amsterdam.

Dixon, R. A. and Steele, C. L. (1999) Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4: 394–400.

Feldmann, K. A. (2001) Cytochrome P450s as genes for crop improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 162–167.

Guo, L., Dixon, R. A. and Paiva, N. L. (1994a) Conversion of vestitone to medicarpin in alfalfa (*Medicago sativa* L.) is catalyzed by two independent enzymes. Identification, purification, and characterization of vestitone reductase and 7,2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol dehydratase. *J. Biol. Chem.* 269: 22372–22378.

Guo, L., Dixon, R. A., and Paiva, N. L. (1994b). The 'pterocarpan synthase' of alfalfa: association and co-induction of vestitone reductase and 7,2'-dihydroxy-4'-methoxy-isoflavanol (DMI) dehydratase, the two final enzymes in medicarpin biosynthesis. *FEBS Lett.* 356: 221–225.

Hakamatsuka, T., Mori, K., Ishida, S., Ebizuka, Y. and Sankawa, U. (1998) Purification of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase from the cell cultures of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry* 49: 497–505.

Hashim, M. F., Hakamatsuka, T., Ebizuka, Y. and Sankawa, U. (1990) Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis. FEBS Lett. 271: 219–222.

Heymann, E. and Mentlein, R. (1981) Carboxylesterases-amidases. Methods Enzymol. 77: 333–344.

Hosokawa, M. (2002) Multiplicity and regulatory mechanism of carboxylesterase isozymes which catalyzes the hydrolysis of long-chain fatty acid esters. Seikagaku 74: 311–316.

Humphreys, J. M. and Chapple, C. (2000) Molecular 'pharming' with plant P450s. Trends Plant Sci. 5: 271–272.

Ichinose, Y., Hisayasu, Y., Sanematsu, S., Ishiga, Y., Seki, H., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Yamada, T. (2001) Molecular cloning and functional analysis of pea cDNA E86 encoding homologous protein to hypersensitivity-related hsr203J. Plant Sci. 160: 997–1006.

Jung, W., Yu, O., Lau, S. M., O'Keefe, D. P., Odell, J., Fader, G. and McGonigle, B. (2000) Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. Nature Biotechnol. 18: 208–212.

Kaczor, C. M., Smith, M. W., Sangwan, J. and O'Brian, M. R. (1994) Plant d-aminolevulinic acid dehydratase. Expression in soybean root nodules and evidence for a bacterial lineage of the Alad gene. Plant Physiol. 104: 1411–1417.

Katagiri, Y., Ibrahim, R.K. and Tahara, S. (2000) HPLC analysis of white lupin isoflavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1118–1125.

Kochs, G. and Grisebach, H. (1986) Enzymic synthesis of isoflavones. *Eur. J. Biochem.* 155: 311–318.

Laurell, H., Contreras, J.A., Castan, I., Langin, D. and Holm, C. (2000) Analysis of the psychrotolerant property of hormone-sensitive lipase through site-directed mutagenesis. *Protein Eng.* 13: 711–717.

Liu, C.J., Blount, J.W., Steele, C.L. and Dixon, R.A. (2002) Bottlenecks for metabolic engineering of isoflavone glycoconjugates in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14578–14583.

Lundqvist, T., Rice, J., Hodge, C.N., Basarab, G.S., Pierce, J. and Lindqvist, Y. (1994) Crystal structure of scytalone dehydratase—a disease determinant of the rice pathogen, *Magnaporthe grisea*. *Structure* 2: 937–944.

Manco, G., Camardella, L., Febbraio, F., Adamo, G., Carratore, V. and Rossi, M. (2000) Homology modeling and identification of serine 160 as nucleophile of the active site in a thermostable carboxylesterase from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Protein Eng.* 13: 197–200.

Manco, G., Giosue, E., D'Auria, S., Herman, P., Carrea, G. and Rossi, M. (2000) Cloning, overexpression, and properties of a new thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 182–192.

Nakamura, K., Akashi, T., Aoki, T., Kawaguchi, K. and Ayabe, S. (1999). Induction of isoflavanoid and retrochalcone branches of the flavonoid pathway in cultured *Glycyrrhiza echinata* cells treated with yeast extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 1618–1620.

Osterlund, T., Danielsson, B., Degerman, E., Contreras, J.A., Edgren, G., Davis, R.C., Schotz, M.C. and Holm, C. (1996) Domain-structure analysis of recombinant rat hormone-sensitive lipase. *Biochem J.* 319: 411–420.

Pontier, D., Godiard, L., Marco, Y. and Roby, D. (1994) hsr203J, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *Plant J.* 5: 507–521.

Sankawa, U. and Hakamatsuka, T. (1997) Biosynthesis of isoflavone and related compounds in tissue cultures of *Pueraria lobata*. In Dynamic aspects of natural products chemistry. Molecular biological approaches. Edited by Ogura, K. and Sankawa, U. pp. 25–48. Kodansha/Harwood Academic, Tokyo.

Satoh, T. and Hosokawa, M. (1995) Molecular aspects of carboxylesterase isoforms in comparison with other esterases. *Toxicol Lett.* 82/83: 439–445.

Sawada, Y., Kinoshita, K., Akashi, T., Aoki, T. and Ayabe, S. (2002) Key amino acid residues required for aryl migration catalyzed by the cytochrome P450 2-hydroxyisoflavanone synthase. *Plant J.* 31: 555–564.

Song, W.C., Funk, C.D. and Brash, A.R. (1993) Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8519-8523.

Stavric, B. (1997) Chemopreventive agents in foods. In Recent Advances in Phytochemistry. Vol. 31. Functionality of Food Phytochemicals. Edited by Johns, T. and Romeo, J.T. pp. 53-87. Plenum Press, New York.

Steele, C.L., Gijzen, M., Qutob, D. and Dixon, R.A. (1999) Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. Arch. Biochem. Biophys. 367: 146-150

Tada, S., Volrath, S., Guyer, D., Scheidegger, A., Ryals, J., Ohta, D. and Ward, E. (1994) Isolation and characterization of cDNAs encoding imidazoleglycerolphosphate dehydratase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 105: 579-583.

Tronchet, M., Ranty, B., Marco, Y. and Roby, D. (2001) HSR203 antisense suppression in tobacco accelerates development of hypersensitive cell death. Plant J. 27: 115-127.

Walden, A.R., Walter, C. and Gardner, R.C. (1999) Genes expressed in *Pinus radiata* male cones include homologs to anther-specific and pathogenesis response genes. Plant Physiol. 121: 1103-1116.

Wei, Y., Contreras, J.A., Sheffield, P., Osterlund, T., Derewenda, U., Kneusel, R.E., Matern, U., Holm, C. and Derewenda, Z.S. (1999) Crystal

structure of brefeldin A esterase, a bacterial homolog of the mammalian hormone-sensitive lipase. *Nature Struct. Biol.* 6: 340–345.

Welle, R. and Grisebach, H. (1988) Induction of phytoalexin synthesis in soybean: enzymatic cyclization of prenylated pterocarpans to glyceollin isomers. *Arch. Biochem. Biophys.* 263: 191–198.

Yu, O., Jung, W., Shi, J., Croes, R.A., Fader, G.M., McGonigle, B. and Odell, J.T. (2000) Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiol.* 124: 781–793.

[産業上の利用の可能性]

以上、本発明では、植物体においてイソフラボンを生産する工程に重要な役割を果たす脱水酵素を単離し、そのアミノ酸配列およびそれをコードする新規なポリヌクレオチドを提供することができた。さらにまた、本発明は、そのようにして得られた遺伝子をイソフラボンを含むイソフラボノイドの产生に応用することを可能とした。

[寄託された生物材料への言及]

(1) イ. 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称およびあて名

名称：独立行政法人産業技術総合研究所

特許生物寄託センター

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6

ロ. イの機関に寄託した日付

平成15年3月20日（原寄託日）

平成16年3月15日（ブタペスト条約に基づく寄託への移管日）

ハ. イの機関が寄託について付した寄託番号

FERM BP-08661

(2) イ. 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称およびあて名

名称：独立行政法人産業技術総合研究所

特許生物寄託センター

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6

ロ. イの機関に寄託した日付

平成15年3月20日（原寄託日）

平成16年3月15日（ブタペスト条約に基づく寄託への移管日）

ハ. イの機関が寄託について付した寄託番号

FERM BP-08662

(3) イ. 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称およびあて名

名称：独立行政法人産業技術総合研究所

特許生物寄託センター

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6

ロ. イの機関に寄託した日付

平成16年3月15日（ブタペスト条約に基づく寄託日）

ハ. イの機関が寄託について付した寄託番号

FERM BP-08663

請 求 の 範 囲

1. 配列番号1で表わされる1-328のアミノ酸配列を実質的に有する2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ。
2. 2, フージヒドロキシ-4' -メトキシイソフラバノンあるいは2, 5, 7-トリヒドロキシ-4' -メトキシイソフラバノンに作用してフォルモネチンあるいはピオカニンAを生成するための脱水反応を促進する請求項1記載の2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ。
3. 請求項1または2に記載の2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に有するポリヌクレオチド。
4. 配列番号2で表わされる1-1178個の塩基からなる2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチド。
5. 配列番号2に含まれるヌクレオチド配列に対して50%以上の相同性を有し、且つ2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチド。
6. *Glycyrrhiza echinata* (カンゾウ) からクローニングされた請求項3~5のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
7. 配列番号2のヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも一部にハイブリダイズするポリヌクレオチド。
8. 配列番号2の少なくとも15個の連続した配列またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにハイブリダイズしうる、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするヌクレオチド配列または2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのcDNAのプライマーまたはプローブとして機能しうるポリヌクレオチド。
9. 請求項3~6のいずれかに記載のポリヌクレオチドでコードされる2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ。

10. 請求項3～6のいずれかに記載のポリヌクレオチドがコードするたんぱく質を用い、2-ヒドロキシイソフラバノンを脱水する方法。
11. 少なくともフラバノン、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ（IFS）と請求項3～6のいずれかに記載のポリヌクレオチドがコードするたんぱく質を用いてイソフラボノイドを生産する方法。
12. 請求項3～6のいずれかに記載されたポリヌクレオチドが挿入されたベクター。
13. 宿主細胞中で、請求項3～6のいずれかに記載されたポリヌクレオチドを発現しうる発現系を含む組換え体DNAまたはRNA。
14. 請求項1.2に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
15. 宿主細胞が酵母である請求項1.4に記載の形質転換された宿主細胞。
16. 寄託番号FERM BP-08662の組換え大腸菌細胞である請求項1.4に記載の宿主細胞。
17. 請求項1.4～1.6のいずれかに記載された宿主細胞を培養することを含む2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの製造方法。
18. 請求項1.4～1.6のいずれかに記載された宿主細胞を用いるイソフラボノイドの生産方法。
19. 請求項3～6のいずれかに記載されたポリヌクレオチドおよび2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ（IFS）をコードするポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞を用いるイソフラボノイドの生産方法。
20. 請求項3～6のいずれかに記載されたポリヌクレオチドが導入されたトランスジェニック植物。
21. マメ科植物である請求項2.0に記載のトランスジェニック植物。
22. 請求項2.0または2.1に記載の植物を用いるイソフラボノイドの生成方法。
23. 請求項2.0または2.1に記載の植物を用いるイソフラボノイドの改変方法。
24. 配列番号3で表わされる1-319のアミノ酸配列を実質的に有する2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ。
25. 2, 7, 4' -トリヒドロキシイソフラバノンあるいは2, 5, 7, 4' -テトラヒドロキシイソフラバノンに作用してダイゼインあるいはゲニステイン

を生成するための脱水反応を促進する請求項24記載の2-ヒドロキシソフラバノンデヒドラターゼ。

26. 請求項24または25に記載の2-ヒドロキシソフラバノンデヒドラターゼをコードするヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に有するポリヌクレオチド。

27. 配列番号4で表わされる1-960の塩基からなる2-ヒドロキシソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチド。

28. 配列番号4に含まれるヌクレオチド配列に対して50%以上の相同性を有し、且つ2-ヒドロキシソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチド。

29. ダイズからクローニングされた請求項26~28のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

30. 配列番号4のヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも一部にハイブリダイズするポリヌクレオチド。

31. 配列番号4の少なくとも15個の連続した配列またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにハイブリダイズし、2-ヒドロキシソフラバノンデヒドラターゼをコードするヌクレオチド配列または2-ヒドロキシソフラバノンデヒドラターゼのcDNAのプライマーまたはプローブとして機能しうるポリヌクレオチド。

32. 請求項26~29のいずれかに記載のポリヌクレオチドでコードされる2-ヒドロキシソフラバノンデヒドラターゼ。

33. 請求項26~29のいずれかに記載のポリヌクレオチドがコードするたんぱく質を用い、2-ヒドロキシソフラバノンを脱水する方法。

34. 少なくともフラバノン、2-ヒドロキシソフラバノンシンターゼ(1FS)と請求項26~29のいずれかに記載のポリヌクレオチドがコードするたんぱく質を用いてイソフラボノイドを生産する方法。

35. 請求項26~29のいずれかに記載されたポリヌクレオチドが挿入されたベクター。

- 3 6. 宿主細胞中で、請求項 2 6 ~ 2 9 のいずれかに記載されたポリヌクレオチドを発現しうる発現系を含む組換え体DNAまたはRNA。
- 3 7. 請求項 3 5 に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
- 3 8. 宿主細胞が酵母である請求項 3 7 に記載の形質転換された宿主細胞。
- 3 9. 寄託番号 FERM BP-08661 の組換え大腸菌細胞である請求項 3 7 に記載の宿主細胞。
- 4 0. 2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ (IFS) をコードするポリヌクレオチドが挿入されたベクターおよび請求項 2 6 ~ 2 9 のいずれかに記載されたポリヌクレオチドが挿入されたベクターにより形質転換された宿主細胞。
- 4 1. 宿主細胞が酵母である請求項 4 0 に記載の形質転換された宿主細胞。
- 4 2. 寄託番号 FERM BP-08663 の組換え酵母である請求項 4 1 に記載の宿主細胞。
- 4 3. 請求項 3 7 ~ 4 2 のいずれかに記載された宿主細胞を培養することを含む 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの製造方法。
- 4 4. 請求項 3 7 ~ 4 2 のいずれかに記載された宿主細胞を用いるイソフラボノイドの生産方法。
- 4 5. 請求項 2 6 ~ 2 9 のいずれかに記載されたポリヌクレオチドが導入されたトランスジェニック植物。
- 4 6. マメ科植物である請求項 4 5 に記載のトランスジェニック植物。
- 4 7. 請求項 4 5 または 4 6 に記載の植物を用いるイソフラボノイドの生成方法。
- 4 8. 請求項 4 5 または 4 6 に記載の植物を用いるイソフラボノイドの改変方法。
- 4 9. カルボキシルエステラーゼのモチーフを持ち脱水反応を触媒する酵素をコードするポリヌクレオチド。
- 5 0. カルボキシルエステラーゼのモチーフを持ち 2-ヒドロキシイソフラバノンの脱水反応を触媒する酵素をコードするポリヌクレオチド。

図 1

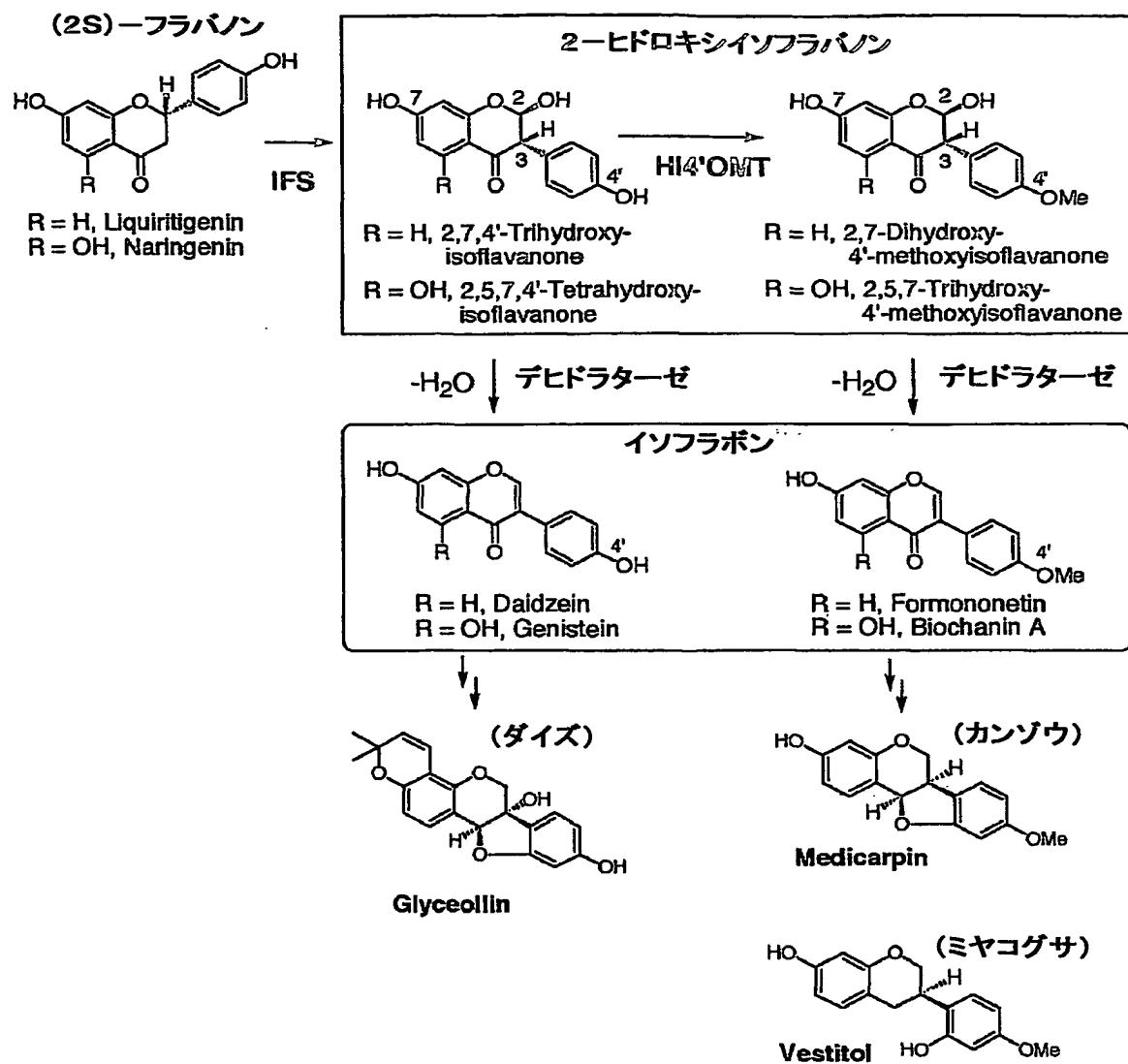
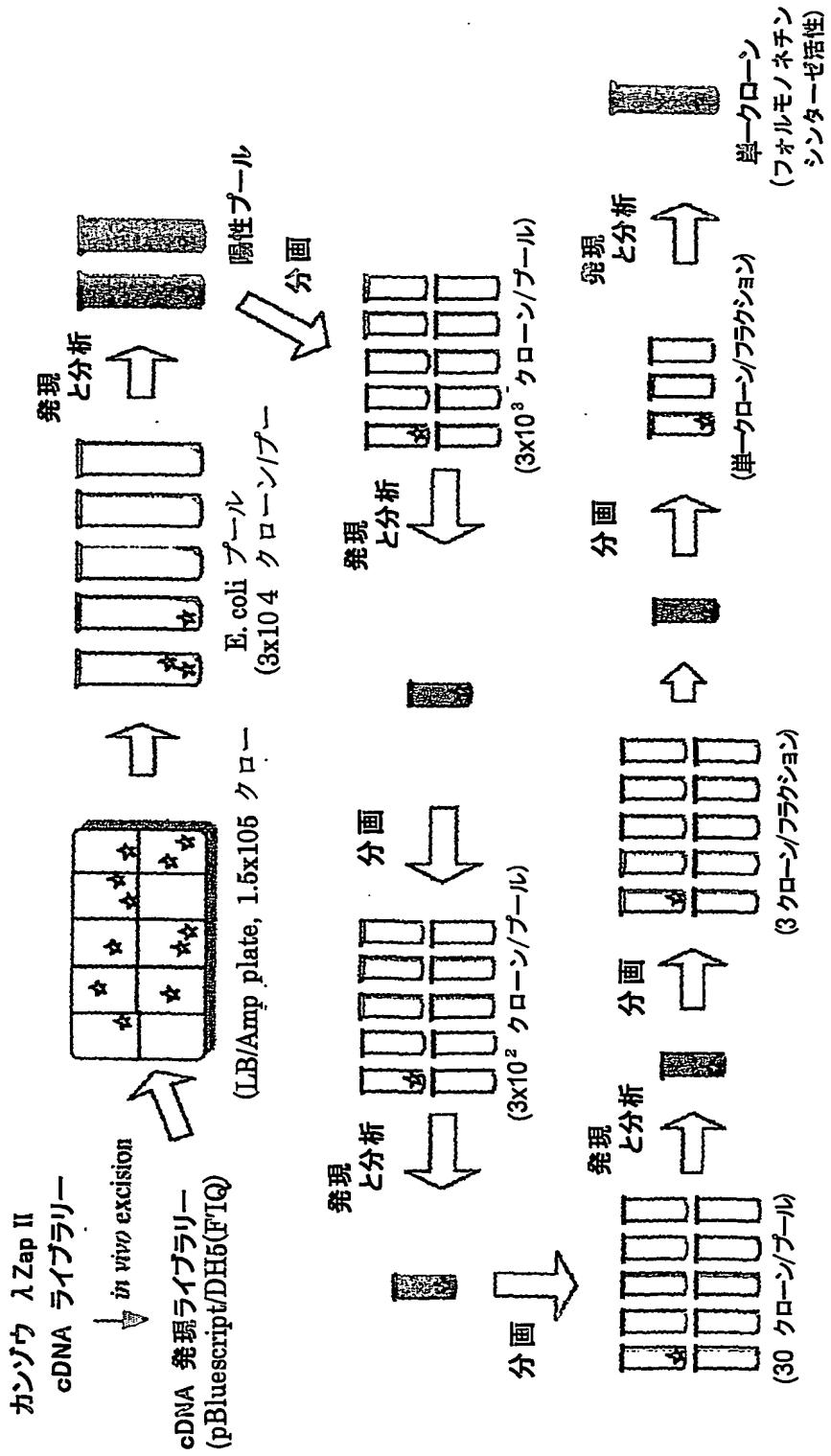


図 2



☆: 2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフランデヒドラターゼ cDNA

図 3

(A)

| | | |
|------------------|-----|---|
| G. echinata HIDM | 1 | [SSTTTTSKIDREDFPLRWNKQIWERFNGSFPPSPSPDPERGWTQWTHWISSE] |
| Soybean HIDH | 1 | [KEIVK-----L-----TRVYKESVETLSSENVAASEPDEQEVASSDIAATADNE] |
| | | |
| G. echinata HIDM | 61 | TISARVYIDPKLNNDTEKLPLWVWIGGAPCLESAFSLHORYLINVASKANVLVVSIEYR |
| Soybean HIDH | 53 | YVSARIFLPSSHHNNNKLPIFLYRHGGAPKVESAFVHRYLNLASEANTIAISVDFR |
| | | |
| G. echinata HIDM | 121 | [AASHEPLPAHNSGRYALCWTCSHTAKPTNADEPDIKICGPNRHYIGGDTSGAWT] |
| Soybean HIDH | 113 | [PLEHEDPQVWQHTTIASTANATITNP-BEADLNAAETKVVWGEISUAVAT] |
| | | |
| G. echinata HIDM | 181 | [AAALRVGAALPGGIRTAQVLSAFLFWGSKPVLSEPVEGHCKSPMQWWNFVYPDAPGG] |
| Soybean HIDH | 172 | [LLERAGNESLPSDKULGGLCCPFFWGSKPIGSEAVEGHEDSLANKWWNFACPDAPGG] |
| | | |
| G. echinata HIDM | 241 | [ICNPYLENPLAPGAPNLATLGCPIKMLVFWAGKDDLRDRGIVWYEAKESGWKGDVELAQYE] |
| Soybean HIDH | 232 | [ICNPMTINPCVPGAPSLATEACSKLLVTITGKDEFRDRLIYHHTWEQSGWQGEQLFDAG] |
| | | |
| G. echinata HIDM | 301 | GEEHOFOIYHPETENSKDLTGRIASFLV |
| Soybean HIDH | 292 | DEEHAFOLFKPETHLAKAMIKRLASFLV |

*

(B)

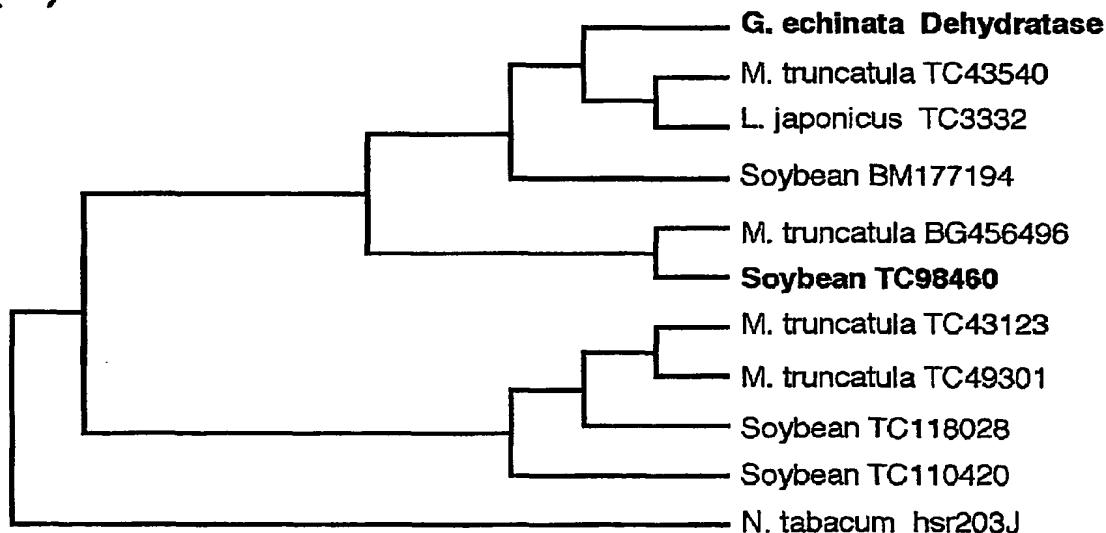


図4

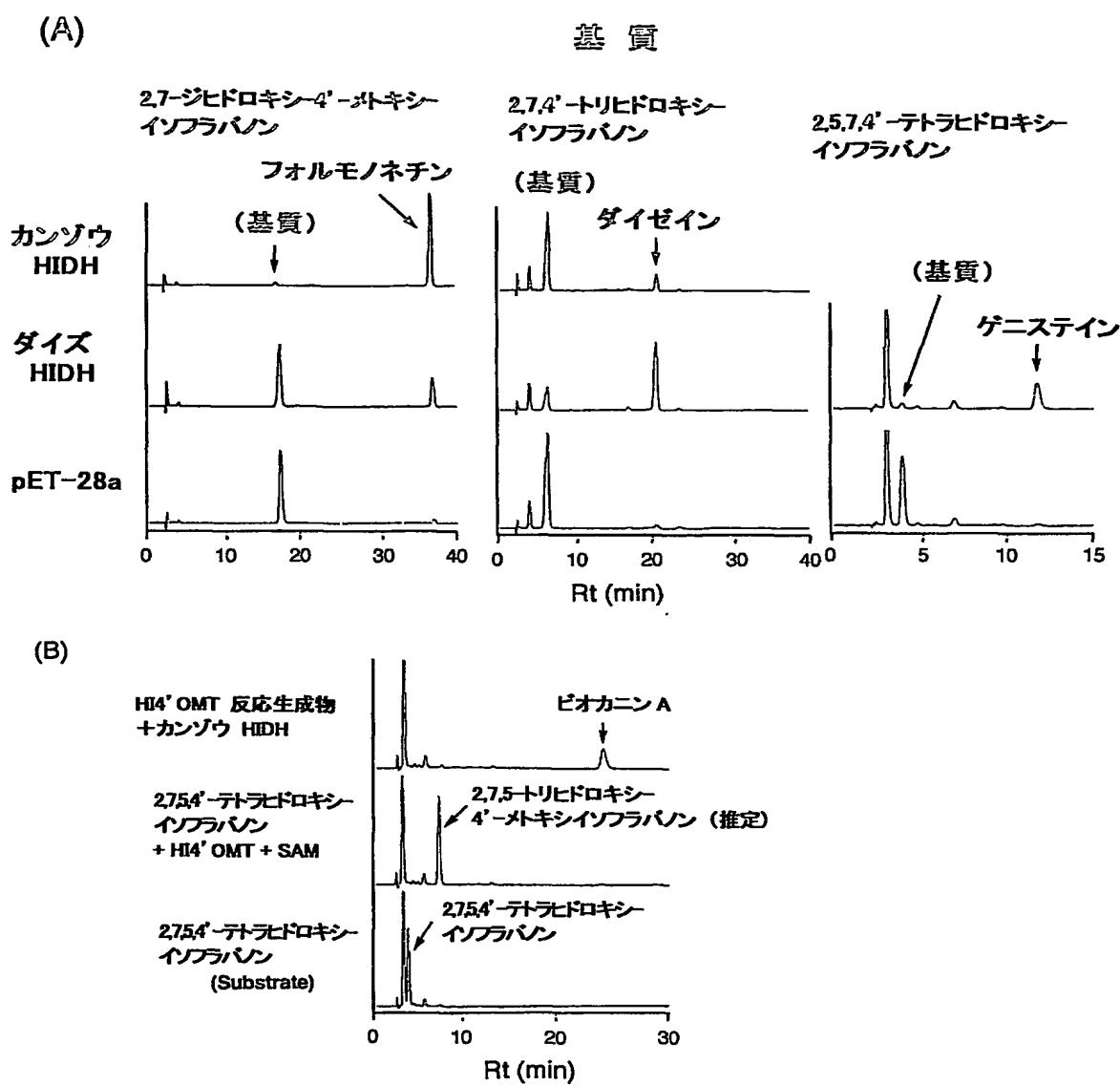


図 5

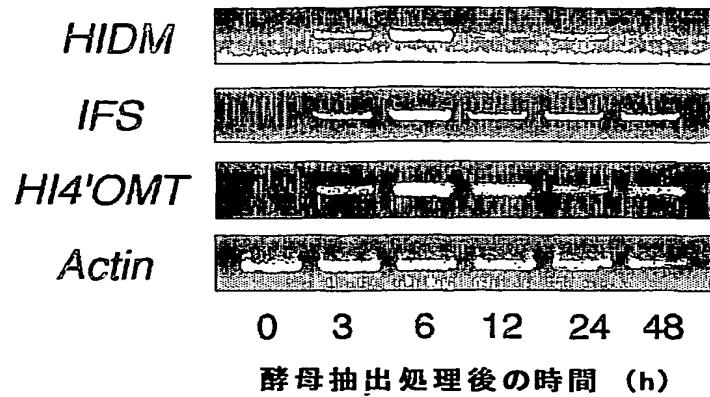
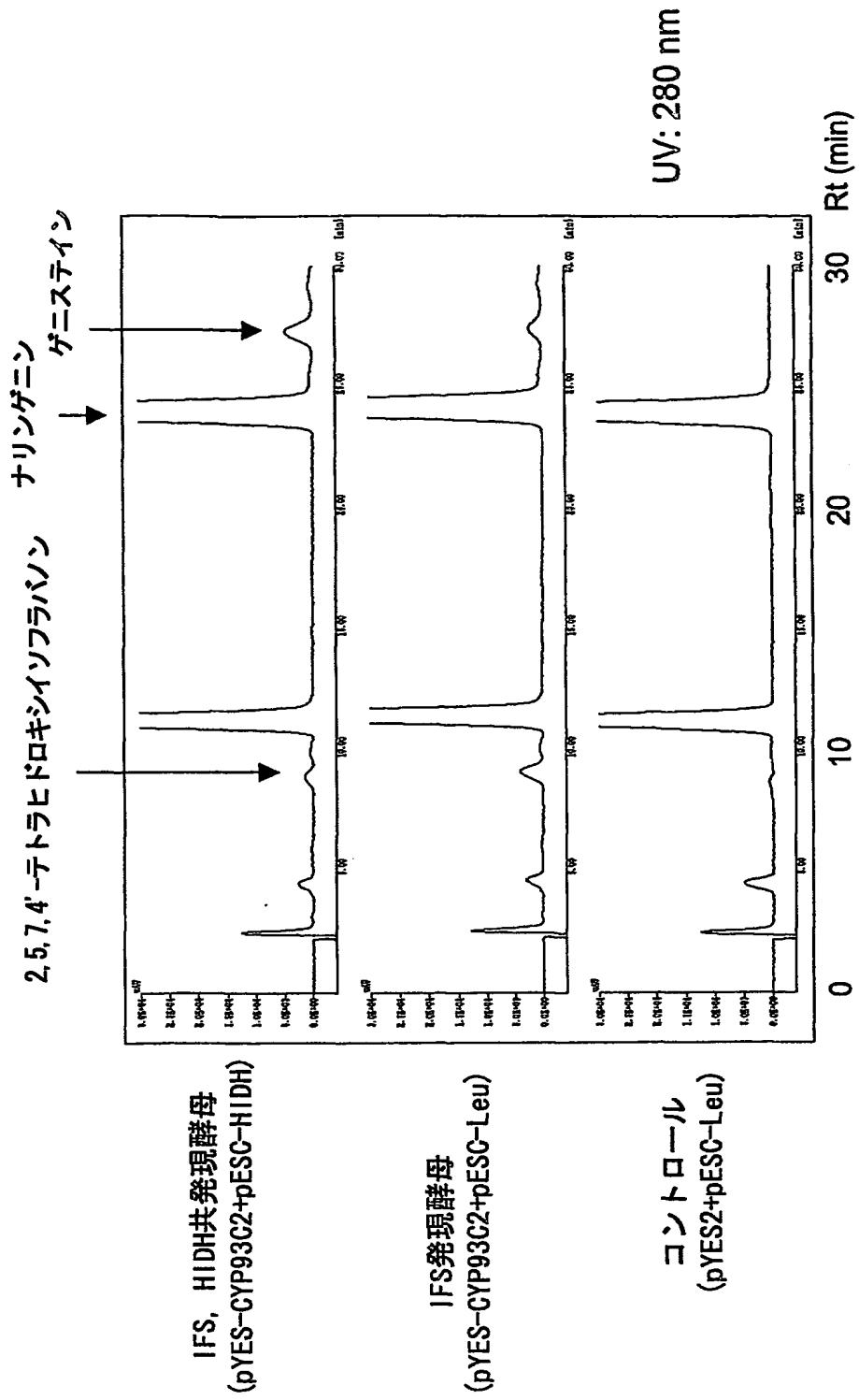


図 6



SEQUENCE LISTING

<110> 学校法人 日本大学 Nihon university

<120> 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチドおよびその応用

<130> 10465

<150> JP 2003-092337

<151> 2003-3-28

<160> 10

<210> 1

<211> 328

<212> PRT

<213> Glycyrrhiza echinata

<220>

<223> Inventor: Ayabe, Shin-ichi

Inventor: Aoki, Toshio

Inventor: Akashi, Tomoyoshi

<400> 1

Met Ala Ser Ser Thr Ser Thr Thr Ser Lys Glu Ile Asp Arg Glu

1

5

10

15

Leu Pro Pro Leu Leu Arg Val Tyr Lys Asp Gly Thr Val Glu Arg Phe

20

25

30

Leu Gly Ser Ser Phe Val Pro Pro Ser Pro Glu Asp Pro Glu Thr Gly

35

40

45

Val Ser Thr Lys Asp Ile Val Ile Ser Glu Asn Pro Thr Ile Ser Ala

50

55

60

Arg Val Tyr Leu Pro Lys Leu Asn Asn Thr Thr Glu Lys Leu Pro Ile

65

70

75

80

Leu Val Tyr Tyr His Gly Gly Ala Phe Cys Leu Glu Ser Ala Phe Ser

85

90

95

Phe Leu His Gln Arg Tyr Leu Asn Ile Val Ala Ser Lys Ala Asn Val

100

105

110

Leu Val Val Ser Ile Glu Tyr Arg Leu Ala Pro Glu His Pro Leu Pro

115

120

125

Ala Ala Tyr Glu Asp Gly Trp Tyr Ala Leu Lys Trp Val Thr Ser His

130

135

140

Ser Thr Asn Asn Asn Lys Pro Thr Asn Ala Asp Pro Trp Leu Ile Lys

145

150

155

160

His Gly Asp Phe Asn Arg Phe Tyr Ile Gly Gly Asp Thr Ser Gly Ala

165

170

175

Asn Ile Ala His Asn Ala Ala Leu Arg Val Gly Ala Glu Ala Leu Pro

180

185

190

Gly Gly Leu Arg Ile Ala Gly Val Leu Ser Ala Phe Pro Leu Phe Trp

195 200 205

Gly Ser Lys Pro Val Leu Ser Glu Pro Val Glu Gly His Glu Lys Ser

210 215 220

Ser Pro Met Gln Val Trp Asn Phe Val Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Gly

225 230 235 240

Ile Asp Asn Pro Leu Ile Asn Pro Leu Ala Pro Gly Ala Pro Asn Leu

245 250 255

Ala Thr Leu Gly Cys Pro Lys Met Leu Val Phe Val Ala Gly Lys Asp

260 265 270

Asp Leu Arg Asp Arg Gly Ile Trp Tyr Tyr Glu Ala Val Lys Glu Ser

275 280 285

Gly Trp Lys Gly Asp Val Glu Leu Ala Gln Tyr Glu Gly Glu His

290 295 300

Cys Phe Gln Ile Tyr His Pro Glu Thr Glu Asn Ser Lys Asp Leu Ile

305 310 315 320

Gly Arg Ile Ala Ser Phe Leu Val

<210> 2

<211> 1178

<212> DNA

<213> Glycyrrhiza echinata

<400> 2

ctattccatt ctttccgtt ca atg gct tct tca acc tca aca acc act tcc 52

Met Ala Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Ser

1 5 10

aaa gag ata gac agg gag ctt cct ctt ctc cgg gtc tac aaa gat 100

Lys Glu Ile Asp Arg Glu Leu Pro Pro Leu Leu Arg Val Tyr Lys Asp

15 20 25

gga acc gtg gag cga ttc cta ggc tca tcg ttt gta cca cct tcc cct 148

Gly Thr Val Glu Arg Phe Leu Gly Ser Ser Phe Val Pro Pro Ser Pro

30 35 40

gaa gac ccc gaa aca ggg gtt tcc acg aaa gac ata gta atc tca gaa 196

Glu Asp Pro Glu Thr Gly Val Ser Thr Lys Asp Ile Val Ile Ser Glu

45 50 55

aac ccc acc atc tct gct cgc gtt tac ctt cca aaa ctg aac aac acc 244

Asn Pro Thr Ile Ser Ala Arg Val Tyr Leu Pro Lys Leu Asn Asn Thr

60 65 70

acc gag aag ctc cca atc ttg gtc tac tac cac ggc ggc gcg ttc tgc 292

Thr Glu Lys Leu Pro Ile Leu Val Tyr Tyr His Gly Gly Ala Phe Cys

75 80 85 90

ctc gaa tct gct ttc tcc ttc ctc cac caa cgc tac ctc aac atc gtt 340

Leu Glu Ser Ala Phe Ser Phe Leu His Gin Arg Tyr Leu Asn Ile Val

95

100

105

gct tcc aag gca aat gtt cta gta gtt tcc atc gag tac agg ctc gcc 388
Ala Ser Lys Ala Asn Val Leu Val Val Ser Ile Glu Tyr Arg Leu Ala

110

115

120

cca gaa cac cct ctt ccg gct gca tat gaa gat ggt tgg tat gct ctc 436
Pro Glu His Pro Leu Pro Ala Ala Tyr Glu Asp Gly Trp Tyr Ala Leu
125 130 135

aaa tgg gtc act tct cat tcc aca aac aac aaa ccc acc aac gct 484
Lys Trp Val Thr Ser His Ser Thr Asn Asn Asn Lys Pro Thr Asn Ala
140 145 150

gac cca tgg ttg atc aaa cac ggt gat ttc aac agg ttc tac atc ggg 532
Asp Pro Trp Leu Ile Lys His Gly Asp Phe Asn Arg Phe Tyr Ile Gly
155 160 165 170

ggt gac act tct ggt gca aac att gca cac aat gcg gct ctt cgt gtt 580
Gly Asp Thr Ser Gly Ala Asn Ile Ala His Asn Ala Ala Leu Arg Val
175 180 185

ggt gct gag gcc tta cct ggg ggg ctg aga ata gca ggg gta ctc tct 628
Gly Ala Glu Ala Leu Pro Gly Gly Leu Arg Ile Ala Gly Val Leu Ser
190 195 200

gct ttt cct ctg ttt tgg ggt tct aag cct gtt ttg tca gaa cct gtc 676
Ala Phe Pro Leu Phe Trp Gly Ser Lys Pro Val Leu Ser Glu Pro Val

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 205 | 210 | 215 | |
| <pre> gag ggg cat gag aag agc tca ccc atg caa gtt tgg aac ttt gtg tac 724 Glu Gly His Glu Lys Ser Ser Pro Met Gln Val Trp Asn Phe Val Tyr </pre> | | | |
| 220 | 225 | 230 | |
| <pre> cca gat gca cca ggt ggc ata gat aac cca cta atc aac cct ttg gca 772 Pro Asp Ala Pro Gly Gly Ile Asp Asn Pro Leu Ile Asn Pro Leu Ala </pre> | | | |
| 235 | 240 | 245 | 250 |
| <pre> cct ggg gct cct aac ttg gcc aca ctt ggg tgt cca aag atg ttg gtc 820 Pro Gly Ala Pro Asn Leu Ala Thr Leu Gly Cys Pro Lys Met Leu Val </pre> | | | |
| 255 | 260 | 265 | |
| <pre> ttt gtt gcg ggg aag gat gat ctt aga gac aga ggg att tgg tac tat 868 Phe Val Ala Gly Lys Asp Asp Leu Arg Asp Arg Gly Ile Trp Tyr Tyr </pre> | | | |
| 270 | 275 | 280 | |
| <pre> gag gct gtg aag gaa agt ggg tgg aaa ggg gat gtg gaa ctt gct cag 916 Glu Ala Val Lys Glu Ser Gly Trp Lys Gly Asp Val Glu Leu Ala Gln </pre> | | | |
| 285 | 290 | 295 | |
| <pre> tat gaa ggg gag gaa cat tgc ttc cag atc tac cat cct gaa act gag 964 Tyr Glu Gly Glu Glu His Cys Phe Gln Ile Tyr His Pro Glu Thr Glu </pre> | | | |
| 300 | 305 | 310 | |
| <pre> aat tct aaa gat ctc atc ggt cgc atc gct tcc ttc ctt gtt tga acaca 1014 Asn Ser Lys Asp Leu Ile Gly Arg Ile Ala Ser Phe Leu Val </pre> | | | |
| 315 | 320 | 325 | |

cagctagact tcgggttcat tattactagt atgtgatttt gtttgattaa tttttgtca 1074
tcaatttgatg ggtataataat tggatttaggg tactagggtt cctgaatcat gtcataatttt 1134
acttttcctg tactattact ttgttatgaa agaattaatg gcat 1178

<210> 3

<211> 319

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 3

Met Ala Lys Glu Ile Val Lys Glu Leu Leu Pro Leu Ile Arg Val Tyr

1 5 10 15

Lys Asp Gly Ser Val Glu Arg Leu Leu Ser Ser Glu Asn Val Ala Ala

20 25 30

Ser Pro Glu Asp Pro Gin Thr Gly Val Ser Ser Lys Asp Ile Val Ile

35 40 45

Ala Asp Asn Pro Tyr Val Ser Ala Arg Ile Phe Leu Pro Lys Ser His

50 55 60

His Thr Asn Asn Lys Leu Pro Ile Phe Leu Tyr Phe His Gly Gly Ala

65 70 75 80

Phe Cys Val Glu Ser Ala Phe Ser Phe Phe Val His Arg Tyr Leu Asn

85

90

95

Ile Leu Ala Ser Glu Ala Asn Ile Ile Ala Ile Ser Val Asp Phe Arg

100

105

110

Leu Leu Pro His His Pro Ile Pro Ala Ala Tyr Glu Asp Gly Trp Thr

115

120

125

Thr Leu Lys Trp Ile Ala Ser His Ala Asn Asn Thr Asn Thr Thr Asn

130

135

140

Pro Glu Pro Trp Leu Leu Asn His Ala Asp Phe Thr Lys Val Tyr Val

145

150

155

160

Gly Gly Glu Thr Ser Gly Ala Asn Ile Ala His Asn Leu Leu Leu Arg

165

170

175

Ala Gly Asn Glu Ser Leu Pro Gly Asp Leu Lys Ile Leu Gly Gly Leu

180

185

190

Leu Cys Cys Pro Phe Phe Trp Gly Ser Lys Pro Ile Gly Ser Glu Ala

195

200

205

Val Glu Gly His Glu Gin Ser Leu Ala Met Lys Val Trp Asn Phe Ala

210

215

220

Cys Pro Asp Ala Pro Gly Gly Ile Asp Asn Pro Trp Ile Asn Pro Cys

225

230

235

240

Val Pro Gly Ala Pro Ser Leu Ala Thr Leu Ala Cys Ser Lys Leu Leu

245 250 255

Val Thr Ile Thr Gly Lys Asp Glu Phe Arg Asp Arg Asp Ile Leu Tyr

260 265 270

His His Thr Val Glu Gln Ser Gly Trp Gln Gly Glu Leu Gln Leu Phe

275 280 285

Asp Ala Gly Asp Glu Glu His Ala Phe Gln Leu Phe Lys Pro Glu Thr

290 295 300

His Leu Ala Lys Ala Met Ile Lys Arg Leu Ala Ser Phe Leu Val

305 310 315

<210> 4

<211> 19

<212> 960

<213> Glycine max

<223> DNA

<400> 4

atg gcg aag gag ata gtg aaa gag ctt ctt cct cta att cga gtg tac 48

Met Ala Lys Glu Ile Val Lys Glu Leu Leu Pro Leu Ile Arg Val Tyr

1 5 10 15

aag gat ggc agc gtg gag cgt ctt cta agc tct gaa aac gtg gca gcc 96
 Lys Asp Gly Ser Val Glu Arg Leu Leu Ser Ser Glu Asn Val Ala Ala

20 25 30

tcc cct gaa gat ccc caa act gga gtc tca tcc aaa gac ata gtc atc 144
 Ser Pro Glu Asp Pro Gin Thr Gly Val Ser Ser Lys Asp Ile Val Ile

35 40 45

gca gac aac ccc tac gtc tcc gct cgc att ttc ctt ccc aaa tcc cac 192
 Ala Asp Asn Pro Tyr Val Ser Ala Arg Ile Phe Leu Pro Lys Ser His

50 55 60

cac act aac aac aaa ctc ccc atc ttc ctc tac ttc cac ggt ggc gcc 240
 His Thr Asn Asn Lys Leu Pro Ile Phe Leu Tyr Phe His Gly Gly Ala

65 70 75 80

ttt tgc gtc gaa tcc gcc ttc tcc ttt ttc gtc cac cgc tat ctc aac 288
 Phe Cys Val Glu Ser Ala Phe Ser Phe Phe Val His Arg Tyr Leu Asn

85 90 95

atc ttg gcc tca gaa gcc aac ata ata gcc atc tcc gtc gac ttc aga 336
 Ile Leu Ala Ser Glu Ala Asn Ile Ile Ala Ile Ser Val Asp Phe Arg

100 105 110

ctc ctc cca cac cac cct atc cct gct gcc tac gaa gac ggt tgg acc 384
 Leu Leu Pro His His Pro Ile Pro Ala Ala Tyr Glu Asp Gly Trp Thr

115 120 125

acc ctc aaa tgg att gct tcc cac gcc aac aac acc acc acc acc aac 432

Thr Leu Lys Trp Ile Ala Ser His Ala Asn Asn Thr Asn Thr Thr Asn

130 135 140

ccg gag cca tgg cta ctc aac cac gcc gac ttc acc aaa gtc tac gta 480

Pro Glu Pro Trp Leu Leu Asn His Ala Asp Phe Thr Lys Val Tyr Val

145 150 155 160

gga ggt gaa acc agc ggt gct aac atc gca cac aac ctg ctt ttg cgt 528

Gly Gly Glu Thr Ser Gly Ala Asn Ile Ala His Asn Leu Leu Leu Arg

165 170 175

gca ggt aac gaa tcc ctc ccc ggg gat ctg aaa ata ttg ggt gga tta 576

Ala Gly Asn Glu Ser Leu Pro Gly Asp Leu Lys Ile Leu Gly Gly Leu

180 185 190

cta tgc tgc ccc ttc ttc tgg ggc tcg aag cca att ggg tcg gag gct 624

Leu Cys Cys Pro Phe Phe Trp Gly Ser Lys Pro Ile Gly Ser Glu Ala

195 200 205

gtt gag ggg cac gag cag agt ttg gcc atg aag gtc tgg aac ttt gcc 672

Val Glu Gly His Glu Gin Ser Leu Ala Met Lys Val Trp Asn Phe Ala

210 215 220

tgc cct gat gcc ccc ggt gga atc gat aac ccc tgg atc aac ccc tgt 720

Cys Pro Asp Ala Pro Gly Gly Ile Asp Asn Pro Trp Ile Asn Pro Cys

225 230 235 240

gtt cct ggg gca ccc tct ttg gcc act ctt gcc tgc tct aag ttg ctc 768

Val Pro Gly Ala Pro Ser Leu Ala Thr Leu Ala Cys Ser Lys Leu Leu

245

250

255

gtt act atc act ggc aaa gac gag ttc aga gac aga gat att ctc tac 816

Val Thr Ile Thr Gly Lys Asp Glu Phe Arg Asp Arg Asp Ile Leu Tyr

260

265

270

cac cac acc gtt gag caa agt ggc tgg caa ggt gaa ctt caa ctc ttt 864

His His Thr Val Glu Gin Ser Gly Trp Gin Gly Glu Leu Gin Leu Phe

275

280

285

gat gct ggc gat gag gag cat gct ttc cag ctc ttc aag cct gag act 912

Asp Ala Gly Asp Glu Glu His Ala Phe Gin Leu Phe Lys Pro Glu Thr

290

295

300

cat ctt gct aaa gcc atg atc aaa cgc ttg gct tct ttt ctg gtt tga 960

His Leu Ala Lys Ala Met Ile Lys Arg Leu Ala Ser Phe Leu Val

305

310

315

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gtcatatggc gaaggagata gtgaa 25

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

agggatccat caaaccagaa aaga 24

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

gtcatatatggc ttcttcaacc tcaac 25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ctggatcctc aaacaaggaa ggaag 25

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ggggccccgga tccacggcga aggagatagt gaaag 35

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

gggagctcga gtcaaaccag aaaagaagcc 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, A01H5/00, C12N1/19, C12N1/21, C12N9/88, C12P17/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, A01H5/00, C12N1/19, C12N1/21, C12N9/88, C12P17/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

· REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X/Y | AKASHI T. et al., New Scheme of the Biosynthesis of Formononetin Involving 2,7,4' -Trihydroxyisoflavanone but Not Daidzein as the Methyl Acceptor., Biosci. Biotechnol. Biochem. (2000), Vol.64, No.10, pages 2276 to 2279 | 1-23/24-50 |
| Y | WO 00/46356 A1 (UNIV NIPPON), 10 August, 2000 (10.08.00), Full text & AU 200023254 A & JP 2000-597416 A | 24-50 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

| | |
|--|--|
| * Special categories of cited documents: | |
| "A" | document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance |
| "E" | earlier application or patent but published on or after the international filing date |
| "L" | document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) |
| "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means |
| "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed |
| "T" | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "X" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "Y" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "&" | document member of the same patent family |

Date of the actual completion of the international search
05 July, 2004 (05.07.04)Date of mailing of the international search report
10 August, 2004 (10.08.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004214

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | AKASHI, T. et al., Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice., Plant.Physiol., (1999.11), Vol.121, No.3, pages 821 to 828 | 1-50 |
| A | AKASHI, T. et al., cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine: 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyl transferase, a critical enzyme of the legume isoflavonoid phytoalexin pathway., Plant.Cell Physiol., (2003.02), Vol.44, No.2, pages 103 to 112 | 1-50 |
| A | HAMANATSUKA, T. et al., Purification of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase from the cell cultures of PUERARIA LOBATA., Phytochemistry (1998), Vol.49, No.2, pages 497 to 505 | 1-50 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2004/004214**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - in written format
 - in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in computer readable form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/00, A01H 5/00, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 9/88, C12P 17/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/00, A01H 5/00, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 9/88, C12P 17/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY(STN), CA(STN), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JSTPlus(JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X/Y | AKASHI T, et al., New Scheme of the Biosynthesis of Formononetin Involving 2, 7, 4'-Trihydroxyisoflavanone but Not Daidzein as the Methyl Acceptor. Biosci Biotechnol Biochem(2000) Vol. 64, No. 10, p. 2276-2279 | 1-23/24-50 |
| Y | WO 00/46356 A1(UNIV NIPPON) 2000. 08. 10, 全文 & AU 200023254 A & JP 2000-597416 A | 24-50 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

| | |
|---|--|
| 国際調査を完了した日 05.07.2004 | 国際調査報告の発送日 10.8.2004 |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員) 左海 匠子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4N 3038 |

| C(続き) . 関連すると認められる文献 | | 関連する 請求の範囲の番号 |
|----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | |
| Y | AKASHI, T. et al., Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. Plant Physiol. (1999. 11) Vol. 121, No. 3, p. 821-828 | 1-50 |
| A | AKASHI, T. et al., cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine: 2, 7, 4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavonoid phytoalexin pathway. Plant Cell Physiol. (2003. 02) Vol. 44, No. 2, p. 103-112 | 1-50 |
| A | HAMANATSUKA, T. et al., Purification of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase from the cell cultures of PUERARIA LOBATA. Phytochemistry (1998) Vol. 49, No. 2, p. 497-505 | 1-50 |

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ 配列表

配列表に関連するテーブル

b. フォーマット 書面

コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる

この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 捷足意見：